Daniela Reis Joaquim de Freitas
(Organizadora)

Principales temas de investigación en Ciencias Biológicas



Atena
Editora
Ano 2023

Daniela Reis Joaquim de Freitas
(Organizadora)

Principales temas de investigación en

Ciencias Biológicas



Atena Editora

Ano 2023

Editora chefe
Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
Editora executiva
Natalia Oliveira
Assistente editorial
Flávia Roberta Barão
Bibliotecária
Janaina Ramos
Projeto gráfico
Camila Alves de Cremo
Ellen Andressa Kubisty
Luiza Alves Batista
Nataly Evilin Gayde
Imagens da capa
iStock
Edição de arte
Luiza Alves Batista

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Principales temas de investigación en ciencias biológicas

Diagramação: Ellen Andressa Kubisty
Correção: Yaiddy Paola Martinez
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizadora: Daniela Reis Joaquim de Freitas

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P957 Principales temas de investigación en ciencias biológicas / Organizadora Daniela Reis Joaquim de Freitas. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2023.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-258-1549-7
DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.497230308

1. Ciencias biológicas. I. Freitas, Daniela Reis Joaquim de (Organizadora). II. Título.

CDD 570

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A pesquisa em Ciências Biológicas abrange uma ampla gama de áreas que estudam a vida em suas diferentes formas, desde os níveis mais básicos da biologia molecular até pesquisas em larga escala em ecossistemas completos. Esta pesquisa proporciona uma compreensão profunda da vida e dos fenômenos que a cercam, e utiliza para tal técnicas avançadas, que possibilitam contribuições significativas para diversas áreas, como a saúde e a alimentação, ecologia e a conservação da biodiversidade e do meio ambiente.

Nesta obra, “Principales temas de investigación en Ciencias Biológicas”, são apresentados artigos que abordam diferentes temas dentro das Ciências Biológicas. Alguns dos temas mais destacados são: genética e biologia molecular (área de pesquisa que se concentra no estudo dos genes, na estrutura e função das proteínas, na regulação genética e nos mecanismos de herança) e aqui vemos a produção de um antígeno de fusão usado para diagnóstico de tuberculose e a utilização de análise genômica para identificação de cárie dental; biologia celular (estuda a estrutura, função e comportamento das células) e fisiologia (estuda o funcionamento dos organismos vivos e de suas partes, seus processos biológicos, bem como as interações entre eles); sobre estes temas temos um trabalho sobre a atividade hepatoprotetora de *Mimosa lacerata* em células HepG2, e um trabalho sobre a avaliação da atividade quimioterápica de beta-sitosterol utilizando um modelo de osteosarcoma em ratos. Outra área abordada nesta obra é a Ecologia e conservação, que estuda os ecossistemas e das interações entre os seres vivos em seu ambiente, bem como a importância da biodiversidade do planeta. Aqui temos uma interessante revisão sobre o gênero *Sargassum*, que pode ser uma alternativa na produção de biomassa com potencial econômico e de forma sustentável.

A Atena Editora possui um corpo editorial pertencente às melhores universidades do Brasil e responsável por selecionar material de qualidade e relevância, como a obra que aqui apresentamos. Que você possa desfrutar de uma boa leitura!!

Daniela Reis Joaquim de Freitas

SUMÁRIO

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE UN ANTÍGENO DE FUSIÓN MEDIANTE INGENIERÍA DE LA TRADUCCIÓN PARA USO EN DIAGNÓSTICO DE LA TB

Data de submissão: 16/05/2023 *Data de aceite: 04/07/2023*

Angel Hilario Alvarez Herrera
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco A.C.
Unidad de Biotecnología médica farmacéutica.
Guadalajara, Jalisco; México.
http://orcid.org/0000-0003-3302-5493

RESUMEN: La biología sintética y la bioingeniería han permitido acelerar la velocidad para generar biotecnológicamente nuevas moléculas con características bioactivas, plataformas que junto a la inmunoproteómica están permitiendo la generación de nuevas moléculas blanco del sistema inmunitario en el combate de las enfermedades infecciosas. Entre las proteínas antigénicas más usadas y reconocidas para mejorar el diagnóstico de la tuberculosis (TB) destacan los antígenos de virulencia ESAT6 y CFP10, sin embargo, su producción usando cultivos de *M. tuberculosis* es de alto riesgo, lento y además con muy bajos rendimientos. Una de las opciones de nueva generación es utilizar una estrategia biotecnológica de ingeniería de la traducción. Al generar un gen sintético artificial codificante para producir una proteína nativa de forma eficiente se optimizan las características fisicoquímicas de la molécula blanco para su expresión en *E. coli*. En este trabajo se obtuvo una sola proteína de fusión ESAT6:CFP10, generándose una molécula claramente soluble a partir de un cultivo bacteriano de fácil manipulación. La proteína recombinante se obtuvo después de la lisis celular de un cultivo bacteriano inducido mediante una purificación por cromatografía de afinidad. Se evaluó la capacidad inmuno-estimulante en cultivos de sangre periférica de animales con una infección tuberculosa activa mediante un inmunoensayo de ELISA para detectar interferón-gamma de bovino. La molécula recombinante demostró un alto potencial para despertar la producción de interferón-gamma, aumentando la sensibilidad del diagnóstico de la infección tuberculosa animal. La generación del gen sintético de ESAT6:CFP10 para *E. coli* demuestra que la plataforma de diseño molecular utilizada para obtener un reactivo biológico complejo resulta ser una buena estrategia rentable para la producción a gran escala de estructuras multi-epítopo con propiedades antigénicas sostenidas con fines inmuno-diagnósticos.

PALABRAS CLAVE: proteína

recombinante, ingeniería de traducción, inmuno-diagnóstico, antigenicidad, *E. coli*.

1 I INTRODUCCIÓN

1.1 Agentes infecciosos de la tuberculosis

La tuberculosis (TB) es un proceso inflamatorio granulomatoso crónico que afecta principalmente al tracto respiratorio del huésped infectado. Los agentes etiológicos *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) y *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), son miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) que residen en los pulmones y los ganglios linfáticos asociados. Aunque la infección por *Mtb* es principalmente una enfermedad infecciosa humana, los seres humanos son la presunta fuente de transmisión de *Mtb* al ganado, sin embargo, la diseminación de *M. bovis* del ganado al hombre es muy común (Wahdan et al., 2020). El patógeno ha sido aislado e identificado en ganado, atribuido al contacto cercano entre humanos y animales, probablemente debido a la transmisión de *Mtb* de pastores y empleados de lechería que padecen un proceso activo de TB (Adesokan et al., 2019; Lombard et al., 2021). Por otro lado, la infección bovina por *M. bovis* causa una infección generalizada en mamíferos que también ocurre en otras especies domésticas y de vida silvestre, lo que contribuye a la persistencia de la enfermedad y se propaga dentro de las poblaciones por infección cruzada entre hospedadores como TB zoonótica (zTB) particularmente en países de bajos ingresos (Kock et al., 2021). La transmisión aérea del patógeno de las vacas a los seres humanos se produce mediante la inhalación de gotitas en aerosol diseminadas por la tos, con una alta prevalencia de infección asintomática principalmente entre ganaderos, veterinarios y trabajadores de mataderos expuestos a ganado infectado (Devi et al., 2021).

1.2 Genómica de las infecciones por micobacterias

La secuencia de los genomas completos de *Mtb* y *M. bovis*, bacterias patógenas para el ser humano y animales domésticos pertenecientes al MTBC, fueron publicados desde 2003. Actualmente, se sabe que el genoma de estas micobacterias contiene un alto contenido de G+C (65.63%) que se refleja en un distintivo molecular codificante dentro de los genes específicos para este género de bacterias. El genoma de *M. bovis* contiene 3,952 genes aparentemente codificantes y 42 elementos de secuencia de inserción (IS). El genoma de *M. bovis* tiene más del 99.95% de identidad con el de *Mtb*, pero su tamaño se ha reducido debido a las deleciones, a eventos únicos y unidireccionales (van Pinxteren et al., 2000).

La cepa de *M. bovis* BCG que actualmente es usada como vacuna contra la tuberculosis humana fue producida a partir de una cepa de *M. bovis* aislada de un bovino infectado y esta se logró mediante pases de atenuación realizados por Calmette y Guérin

para producir la vacuna contra la TB. Mediante análisis molecular se corroboró la deleción de la región cromosomal de diferencia 1 (RD1) en todas las cepas de BCG analizadas y se identificaron polimorfismos genéticos de un nucleótido (SNPs) entre *Mtb* H37Rv y múltiples cepas de BCG. De esta manera, se explica que la pérdida de virulencia se debe a la pérdida de RD1 así como a la acumulación de deleciones genéticas adicionales del tipo SNPs (Mahairas et al., 1996). RD1 es una región de 9,505 pb que contiene importantes genes de virulencia, entre ellos destacan dos antígenos inmunoestimulantes de células T como el antígeno de secreción temprana de 6 kDa (ESAT6) y la proteína de 10 kDa del filtrado de cultivo (CFP10). Se cree que la región RD1 es la principal región que se perdió durante los 230 pases seriados de *M. bovis* por Calmette y Guérin entre 1908 y 1921; posiblemente es responsable de la principal atenuación de *M. bovis* BCG. Los genes que codifican CFP10 y ESAT6 se encuentran adyacentes en la región RD1, están orientados a la misma dirección y forman parte de un mismo operón (Esx1) por lo que son regulados coordinadamente y expresados durante la fase infectiva de *Mtb* y *M. bovis*.

1.3 Diagnóstico complementario diferencial de la tuberculosis

En los últimos años ha habido un significativo progreso en la identificación de algunas proteínas antigénicas del complejo *M. tuberculosis,* en un intento por identificar aquellas que sean más específicas que las del reactivo purificado de proteínas PPD. Se ha avanzado considerablemente en la identificación y utilización de los denominados antígenos de diferenciación DIVA (del inglés: *differentiation of infected and vaccinated individuals*). Los antígenos de diagnóstico diferencial DIVA incluyen a CFP10 y ESAT6 que están codificados por genes localizados en la región RD1 del genoma y que están ausentes en la cepa vacunal BCG, motivo por el cual estos dos antígenos en la actualidad son extensamente considerados para el diagnóstico de los casos positivos de la infección micobacteriana. Así, estos antígenos han sido utilizados para diferenciar sujetos infectados de los vacunados con muy buenos resultados. Los casos de TB humana debidos a *M. bovis* son igualmente propensos a la misma gravedad que los casos debidos a *Mtb*, los cuales son clínicamente indistinguibles a menos que se utilicen pruebas moleculares mediante genotipado y análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en la identificación a nivel de especie después del aislamiento por cultivo del patógeno (Rodwell et al., 2010).

Por otro lado, la prueba más utilizada para el diagnóstico de la TB es la prueba cutánea de hipersensibilidad retardada al reactivo denominado PPD (Derivado Proteico Purificado), también conocida como la prueba de la tuberculina (TST), es el principal método utilizado para identificar la exposición a *Mtb*. Los avances en el campo de la genómica y las técnicas de inmunodetección han permitido el desarrollo de sistemas de diagnóstico basados en la producción de interferón-gamma (IFN-γ) por células T estimuladas con ESAT6 y CFP10. Los ensayos de liberación de IFN-γ (IGRAs del inglés: *IFN-γ release*

assays) han surgido como una alternativa para la detección de TB. Actualmente existen versiones comerciales como el QuantiFERON-TB Gold y el T-SPOT.TB, que consisten en la cuantificación del IFN-γ producido por leucocitos de sangre total estimulados con los antígenos PPD, ESAT6, CFP10 y TB7.7 en el kit QuantiFERON-IT de tercera generación. Estas pruebas de diagnóstico tienen mayor especificidad, especialmente en población vacunada con BCG (Barrios-Payán et al., 2010).

1.4 Biología sintética para la sobreexpresión de proteínas recombinantes

Las fábricas de células se han convertido en un actor establecido en la producción sostenible de productos biológicos probados con un valor de cientos de miles de millones de USD/año en los mercados mundiales (Davy et al., 2017). Un aspecto común en el desarrollo de tales fábricas de células es la búsqueda continua de una mayor productividad a través de métodos de ingeniería genética dirigidos o basados en la selección. Se puede lograr una alta actividad enzimática mediante la optimización de la transcripción, la traducción, las modificaciones postraduccionales y las condiciones del proceso (Liu et al., 2013). Una estrategia común es emplear promotores fuertes para sobre expresar genes de biosíntesis de productos. Los promotores altamente activos logran mayores tasas de producción de proteínas al aumentar los respectivos niveles de ARNm en la célula. Se pueden distinguir dos enfoques centrados en la traducción que tienen como objetivo optimizar la traducción en lugar de la transcripción. Con este fin, el primer enfoque intenta estabilizar el ARNm, mientras que el segundo busca aumentar la eficiencia de traducción.

El sistema de expresión de *E. coli* es una herramienta generalizada para obtener proteínas heterólogas recombinantes, incluidas las de origen micobacteriano mediante mejoras biotecnológicas (Kulshrestha et al., 2005, Restrepo-Pineda et al., 2019). Las secuencias codificantes de genes de micobacterias tienden a contener un mayor contenido de citosina y guanina que el genoma de *E. coli* con alrededor del 65% de G + C en secuencias genómicas (Andersson y Sharp, 1996), además la sobreexpresión de antígenos micobacterianos en *E. coli* puede conducir a la formación de cuerpos de inclusión.

La ingeniería de la traducción y expresión de proteínas a escala en *E. coli* se puede lograr mediante un diseño basado en tecnología genética que puede alterar las secuencias de genes tanto naturales como recombinantes mediante optimización del uso de codones (Hatfield y Roth, 2007). Muchos algoritmos de optimización de codones se han desarrollado con distintas tasas de éxito (Nieuwkoop et al., 2019). Mediante esta estrategia biotecnológica se obtuvieron artificialmente los dos principales antígenos micobacterianos ESAT6 y CFP10 como una sola proteína híbrida por un uso ajustado de codones de las secuencias genéticas codificantes. La molécula recombinante resultante demostró una fuerte conservación antigénica para el diagnóstico de la TB, lo que confirma que las moléculas híbridas diseñadas por optimización de codones puede ser una herramienta

viable y rentable para la obtención de biomarcadores de la infección humana y animal.

2 I METODOLOGÍA

2.1 Obtención de un gen sintético codificante de ESAT6:CFP10

El gen optimizado de la proteína de fusión ESAT6:CFP10 se obtuvo mediante un servicio externo de optimización de secuencias para expresión, generando un plásmido pUC57 recombinante con un gen inserto a diseño para expresar las proteínas nativas obtenidas de la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot (claves de acceso P0A565 y P0A567) correspondientes a la cepa de *M. bovis* AF2122/97. El diseño incluyó un enlazador repetido de glicina-serina que añadió una secuencia de quince residuos adicionales para un linker de unión de GS largo el extremo C-terminal de ESAT6 para unir los dos dominios de la proteína fusionada (Tabla 1). A la secuencia sintética se le adicionaron los sitios de restricción reconocidos por las enzimas *Nco*I y *Xho*I en los extremos 5' y 3', respectivamente, a fin de usar los sitios de restricción para subclonar la secuencia completa en el vector de expresión bacteriano pET28a.

El plásmido pUC57-ESAT6:CFP10 se transformó a la cepa electrocompetente de *E. coli* TOP10 seleccionando la cepa transformante en placas de agar LB con ampicilina como agente de selección. Una de las cepas transformantes se inoculó en 4 mL de medio líquido LB incubándose a 37°C en agitación durante 20 h. Se obtuvo la pastilla celular del cultivo centrifugando a 6,000 rpm durante 10 min. Posteriormente, el paquete celular obtenido se procesó con un kit Plasmid Miniprep para extracción de DNA plasmídico. El DNA se cuantificó con un espectrofotómetro Nano Drop NT-1000 a una absorbancia de 260 nm. Una alícuota de 10 µL de DNA plasmídico obtenido se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% con SYBR Safe y se visualizó con luz ultravioleta usando un analizador de imágenes GelDoc XR usando el software Quantity One para confirmar la presencia del plásmido. El plásmido recombinante se almacenó a -20°C hasta su uso.

2.2 Subclonación de la secuencia ESAT6:CFP10 en plásmido pET28a

Para la subclonación del gen híbrido, se digirió una alícuota del plásmido pUC57 con las enzimas *Nco*I y *Xho*I y los fragmentos de digestión se obtuvieron a partir de un gel de agarosa usando el kit Gen Elute gel extraction. Se realizó la ligación del fragmento de gen híbrido digerido con un fragmento linearizado del vector pET28a digerido con las mismas enzimas de restricción mediante una reacción de ligación con la enzima T4 DNA ligasa por incubación a 16°C durante 18 h. La mezcla de ligación con el plásmido recombinante pET28-ESAT6:CFP10 se transformó de la misma forma anteriormente descrita a células electrocompetentes de *E. coli* TOP10, y posteriormente se recuperaron

los plásmidos a partir de cultivos que fueron seleccionados de placas con agar kanamicina de la forma descrita. El plásmido pET28-ESAT6:CFP10 se obtuvo de una de las cepas de *E. coli* TOP10 seleccionadas mediante un cultivo líquido y aislamiento de plásmidos de la forma descrita con el kit de Miniprep y se procedió a introducirlos por transformación a un cultivo electrocompetente de la cepa *E. coli* BL21 mezclando con 1 µL del plásmido recombinante. Finalmente, las células BL21 transformantes se obtuvieron en medio sólido LB con kanamicina para seleccionar las transformantes.

Tabla 1. Gen optimizado para la expresión de ESAT6:CFP10 en *E. coli*.

```
a CCATGGGC ACG GAA CAA CAG TGG AAC TTT GCG GGC ATC GAA GCG GCG GCA
     M  G   T   E   Q   Q   W   N   F   A   G   I   E   A   A   A
TCA GCG ATT CAG GGT AAC GTC ACG AGC ATT CAT AGC CTG CTG GAT GAA GGC
b S   A   I   Q   G   N   V   T   S   I   H   S   L   L   D   E   G
AAA CAG TCC CTG ACC AAA CTG GCC GCG GCA TGG GGC GGT AGC GGT TCT GAA
 K   Q   S   L   T   K   L   A   A   A   W   G   G   S   G   S   E
GCC TAT CAG GGT GTC CAG CAA AAA TGG GAC GCC ACC GCA ACG GAA CTG AAC
 A   Y   Q   G   V   Q   Q   K   W   D   A   T   A   T   E   L   N
AAT GCT CTG CAG AAC CTG GCA CGT ACC ATT TCT GAA GCG GGT CAA GCT ATG
 N   A   L   Q   N   L   A   R   T   I   S   E   A   G   Q   A   M
GCG AGT ACC GAA GGC AAT GTG ACG GGC ATG TTT GCC GGC GGT GGC  GGT TCA
 A   S   T   E   G   N   V   T   G   M   F   A   G   G   G    G   S
GGC GGT GGC GGT TCG GGC GGT GGC GGT AGC ATG GCA GAA ATG AAA ACC GAT
 G   G   G   G   S   G   G   G   G   S   M   A   E   M   K   T   D
GCT GCG ACG CTG GCC CAG GAA GCA GGC AAC TTC GAA CGC ATT TCA GGT GAT
 A   A   T   L   A   Q   E   A   G   N   F   E   R   I   S   G   D
CTG AAA ACC CAG ATC GAC CAA GTT GAA AGT ACC GCC GGT TCC CTG CAG GGT
 L   K   T   Q   I   D   Q   V   E   S   T   A   G   S   L   Q   G
CAA TGG CGT GGC GCC GCA GGT ACC GCT GCC CAG GCG GCA GTG GTT CGT TTT
 Q   W   R   G   A   A   G   T   A   A   Q   A   A   V   V   R   F
CAA GAA GCT GCG AAC AAA CAG AAA CAA GAA CTG GAC GAA ATT AGC ACG AAT
 Q   E   A   A   N   K   Q   K   Q   E   L   D   E   I   S   T   N
ATC CGT CAG GCG GGC GTC CAG TAT TCC CGT GCT GAT GAA GAA CAA CAA CAG
 I   R   Q   A   G   V   Q   Y   S   R   A   D   E   E   Q   Q   Q
GCG CTG AGT AGC CAG ATG GGT TTC CTCGAG
 A   L   S   S   Q   M   G   F
```

[a] Secuencia de codones optimizada a partir de los genes nativos de la base de datos de *M. bovis* AF2122/97 (http://genolist.pasteur.fr/BoviList). Negritas y subrayadas: sitios de restricción para *Nco*I y *Xho*I; secuencia codificante del linker GS.
[b] Código de aminoácidos de una sola letra de la traducción para la proteína de fusión ESAT6:CFP10.

2.3 Producción de la proteína ESAT6:CFP10 en *E. coli*

Se realizó la inducción de la producción de la proteína ESAT6:CFP10 inoculando 5 mL de medio líquido LB, el que después de 18 h de cultivo a 37°C se agregó a 500 mL de medio líquido LB en un matraz Erlenmeyer de 1 L, incubándose posteriormente a 30°C/250 rpm hasta una DO a 600 nm de 0.5-0.8. En ese punto, se indujo la expresión agregando al cultivo isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) a una concentración final de 0.5 mM. Las células se cosecharon por centrifugación a 5,000 rpm/15 min/4°C después de 4 h de la adición del IPTG. Se usó el pellet celular y se descartó el medio de cultivo

sobrenadante. Para la confirmación de la presencia de la proteína recombinante de fusión ESAT6:CFP10. El pellet celular se resuspendió en 10% del volumen de cultivo con buffer PBS con Tritón X-100 al 0.1% y se lisó mediante sonicación. Se separaron las fracciones solubles por centrifugación a 5,000 rpm/20 min/4°C descartando el pellet y conservando el sobrenadante rico en proteína intracelular.

La comprobación de la producción de la proteína recombinante ESAT6:CFP10 se realizó a usando 20 µL de la fracción soluble del lisado celular tratada con buffer de Laemmli 2X y sometida a una electroforesis SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12% durante 1 h a 120 V. El gel se tiñó por tinción de Coomassie para comprobar la presencia de la banda de 23 kDa correspondiente a la molécula ESAT6:CFP10. De igual forma otro gel se corrió y se le realizó una electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa con una cámara para transferencia para comprobar la identidad de la banda de 23 kDa mediante un Western blot con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-His6x de acuerdo a una cola de 6 histidinas presente en la proteína recombinante, y rebelando la membrana con un anticuerpo secundario de chivo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa.

2.4 Purificación de la proteína ESAT6:CFP10 por cromatografía de afinidad

La purificación se realizó mediante el método estándar por cromatografía de afinidad a níquel en columnas Bio-Scale mini IMAC de 5X5 mL. La fracción celular de la fase soluble rica en proteína ESAT6:CFP10 se pasó por la columna con la ayuda de una jeringa, se dejó reposando la columna en hielo por 15 a 30 min, y después se procedió a hacer el lavado buffer de lavado A (imidazol 50 mM, NaCl 250 mM, NaH2PO4 20 mM, pH=8.0) y después con buffer de lavado B (imidazol 70 mM, NaCl 250 mM, NaH2PO4 20 mM, pH=8.0). Finalmente, la proteína ESAT6:CFP10 se eluyó de la columna con buffer de elución (imidazol 250 mM, NaH2PO4 20 mM, pH=8.0) en fracciones de 5 mL. Las fracciones recolectadas en cada paso se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% a fin de detectar la proteína de interés en las fracciones de elución.

Las fracciones de elución elegidas por contener la proteína recombinante se colocaron en un tubo de membrana para diálisis con un punto de corte de 11 kDa y se dializaron contra buffer de diálisis (HEPES 15 mM, NaCl 10 mM, glicerol 1%, pH=7.5), sumergiendo la membrana en 200 mL del buffer y dejando en agitación regular a 4°C por 4 h, haciendo 4 cambios y al final se recuperó la proteína y se colocó en viales de criopreservación para su congelación a -70°C hasta su uso en las pruebas de antigenicidad. La concentración de proteína se cuantificó en una alícuota de cada fracción de purificación dializada mediante el método de Bradford adaptado en microplaca de 96 pozos, haciendo una curva de calibración de albúmina sérica bovina (BSA).

2.5 Evaluación de la antigenicidad de la proteína ESAT6:CFP10

Para la determinación de la capacidad inmunoestimulante de la proteína de fusión mediante la inducción de la producción de IFN-γ por las células T-CD4+ en sangre periférica fresca de bovinos procedentes de hatos ganaderos en los que se ha comprobado la prevalencia de la infección mediante las pruebas de la tuberculina (TST) en campo de hipersensibilidad retardada en pliegue caudal y cervical comparativa como lo establece la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995 de la Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). Se obtuvieron 48 muestras de sangre bovina de una zona detectada con una alta prevalencia de la infección y 60 muestras de una zona de baja prevalencia en tubos con heparina de litio de 10 mL y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su procesamiento en el laboratorio en un periodo máximo de 8 hr.

Cada muestra de sangre correspondiente a un animal, se distribuyó en 2 alícuotas de 0.75 mL en una placa de 24 pozos y se agregaron las mezclas antigénicas siguientes en cada pozo en el orden siguiente: PPDB (PPD de *M. bovis*), PPDA (PPD de *M. avium*) y ESAT6:CFP10 (antígenos de virulencia de *M. bovis*). La antigenicidad se midió mediante la medición indirecta de la producción de IFN-γ de acuerdo al procedimiento del kit Bovigam™ (Prionics) para el diagnóstico de la TB bovina en sangre, el cual contempla el uso de los antígenos PPDB y PPDA (a la concentración de 0.3 mg/mL). El antígeno ESAT6:CFP10 se usó individualmente a una concentración de 2 μg/mL de sangre. Después de la incubación para la estimulación antigénica, el plasma se obtuvo por centrifugación de las placas de cultivo celular a 2,500 rpm durante 15 min. El plasma se almacenó a -20°C hasta realizar el ensayo de ELISA con el mismo kit de Bovigam™. La producción del IFN-γ se calculó directamente mediante la lectura de la absorbancia de cada muestra estimulada mediante un lector para placas de ELISA a 450 nm registrando los valores de absorbancia que fueron utilizados para estimar y graficar los niveles de IFN-γ producidos.

3 | RESULTADOS

Se recibió en el plásmido pUC57 el gen hibrido *esxA:esxB* (ESAT6:CFP10) cuyo marco de lectura se optimizó para ser expresado en *E. coli.* Primero se transformó a la cepa de *E.coli* TOP10 para replicarlo y posteriormente se aisló para liberarlo del vector mediante corte con las enzimas *Xho*I y *Nco*I. Después de la subclonación mediante ligación del gen híbrido *esxA*:*esxB* en pET28a y posterior transformación a *E. coli* TOP10, se confirmó la inserción del fragmento codificante del gen híbrido en el vector de expresión mediante corte enzimático con *Nco*I y *Xho*I.

Posterior a la comprobación de la construcción en el plásmido recombinante pET28-ESAT6:CFP10, este fue transformado a la cepa de *E. coli* BL21 para su expresión, habiendo obtenido clonas bacterianas de esta cepa en medio de cultivo con kanamicina. Se realizó la comprobación de la presencia del plásmido recombinante en una de las clonas

bacterianas seleccionadas mediante aislamiento de plásmidos y una restricción enzimática con las enzimas usadas para su inserción demostrando tener la cepa el plásmido con el gen híbrido integrado (Figura 1). Posteriormente, se procedería a realizar la inducción de la expresión de la proteína de fusión ESAT6:CFP10 en la cepa *E. coli* BL21.

La expresión de la proteína resultó de forma óptima demostrando que la construcción del gen híbrido que se diseñó de acuerdo al uso de codones preferencial para *E. coli* permitió una síntesis de proteína celular mayor a pesar de tratarse de una proteína heteróloga (de origen micobacteriano). Cabe destacar que la proteína se obtuvo en la fracción soluble del cultivo inducido a pesar de la gran cantidad de proteína producida, y no en cuerpos de inclusión los cuales son muy comunes en sistemas de expresión de proteínas heterólogas en bacterias. Además, se comprobó si la proteína de fusión sintetizada y observada en el cultivo inducido correspondía a la proteína recombinante mediante Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal contra la etiqueta de His6x de la proteína (Figura 2). Se observó que la proteína total obtenida del cultivo inducido muestra un reconocimiento específico por el anticuerpo anti-His6x a la misma altura (23 kDa) de la banda mayoritaria de la proteína detectada por tinción de Coomassie presente en el cultivo inducido, comprobando así que la proteína observada en efecto corresponde a la proteína de fusión ESAT6:CFP10 codificada por el plásmido recombinante pET28a.

Después de la inducción en 500 mL de cultivo se obtuvo una fracción soluble abundante del lisado celular con una proteína recombinante de ESAT6:CFP10 mayoritaria. La proteína producida en este cultivo se purificó mediante cromatografía de afinidad a etiquetas de His6x utilizando la fracción soluble obtenida. Después de limpiar la fracción de elución con la proteína enriquecida por equilibrio mediante diálisis en HEPES y tratamiento con Triton X-114 para eliminar las endotoxinas, la proteína permaneció como una suspensión soluble con una pureza estimada en alrededor del 95%. Según la concentración calculada de ESAT6:CFP10, el rendimiento de la proteína recombinante, solo en la fracción soluble, se estimó en 67 mg/L de cultivo bacteriano, almacenándose a -70°C hasta su uso para la inducción de respuestas de inducción de la respuesta inmune celular en sangre de bovino.

La evaluación de la antigenicidad de la proteína híbrida ESAT6:CFP10 de *M. bovis* se evaluó utilizando sangre de bovino con infección bacteriana confirmada por la prueba de la tuberculina TST. La antigenicidad se midió directamente por la producción de la interleucina IFN-γ, la cual es indicadora de una respuesta inmune activa y de memoria de tipo celular contra los antígenos de *M. bovis* si hubo contacto previo con este agente infeccioso, por lo que la magnitud de la densidad óptica obtenida por la prueba de ELISA Bovigam^{TM} para el diagnóstico de la TB bovina es directamente proporcional a la identificación de un contacto previo con el agente infeccioso de la TB bovina y por ende a la positividad de la prueba. De 48 muestras de sangre de una zona de alta prevalencia, 47 desarrollaron una DO mostraron una magnitud de producción de IFN-γ muy alta (>0.5) al ser tratadas sólo con la proteína de fusión ESAT6:CFP10 pura, casi comparada con aquella provocada por la mezcla de

antígenos micobacterianos PPDB del propio kit de diagnóstico, lo cual demuestra que esta proteína de fusión conserva la antigenicidad de los dos antígenos que ya ha sido reportada y más que

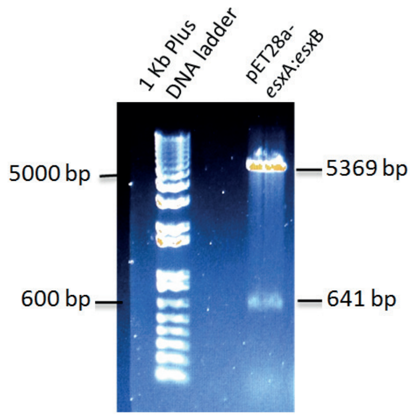


Fig. 1. Comprobación de la clonación de *esxA:esxB*. El fragmento de ADN híbrido *esxA:esxB* de 641 pb se confirmó mediante una restricción enzimática con *Nco*I y *Xho*I a partir de pET28a-ESAT6:CFP10 recombinante obtenido de una sola clona positiva de *E. coli* TOP 10 (tomada de Gutiérrez-Ortega et al., 2021).

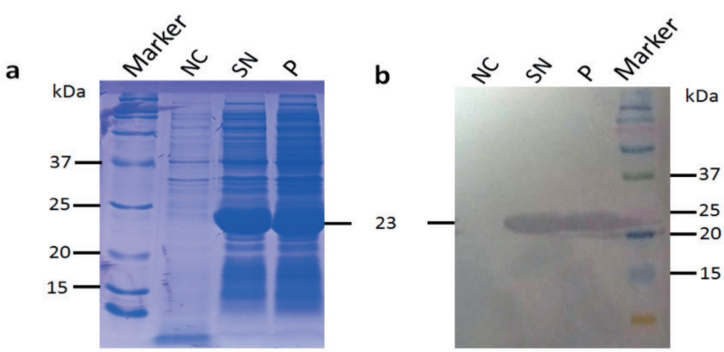


Fig. 2. Comprobación de la expresión inducible de ESAT6:CFP10 por SDS-PAGE y Western blot en un lisado de cultivo de *E. coli* BL21. Se analizaron fracciones tanto solubles del sobrenadante (SN) como insolubles de la pastilla celular (P) y se compararon con un control negativo (NC) sin inducción con IPTG. (a) Proteína total vista por tinción de Coomassie; (b) proteína total analizada por Western blot en membrana de nitrocelulosa con un anticuerpo monoclonal anti-His6x (tomada de Gutiérrez-Ortega et al., 2021).

demostrada en diversos estudios para validar estos dos antígenos para el diagnóstico de la TB bovina y humana. En 16 muestras no se despertó la misma respuesta a pesar de que la intensidad de producción de IFN-γ fue muy evidente debida al estímulo por el reactivo PPDB; sin embargo, la media de la DO obtenida por el estímulo con la proteína de fusión pura fue de 1.4 (Figura 3A), lo cual demuestra que esta proteína por si sola logra

mantener una buena sensibilidad para detectar una buena proporción de animales con una infección por *M. bovis*, lo que nos indica que podría incluirse aditivamente la proteína de ESAT6:CFP10 al reactivo PPDB para lograr un aumento considerable de la sensibilidad de la prueba de diagnóstico *in vitro* de la TB bovina tal y como ya se hace en los kits de segunda generación para el diagnóstico de la TB en humanos y bovinos usando péptidos derivados de estos dos antígenos.

Por otro lado, de 60 muestras de sangre bovina analizadas provenientes de una zona de baja prevalencia, solo 2 muestras (3%) mostraron una alta producción de IFN-γ provocada por el antígeno de fusión ESAT6:CFP10 (Figura 3B). Siete muestras tuvieron una alta intensidad de producción de IFN-γ provocada por PPDB y alrededor de 12 muestras por PPDA, lo cual sugiere que en este hato puede haber un predominio de infecciones por micobacterias ambientales como *M. avium* y muy probablemente la mayoría de los casos observados como altos productores de IFN-γ por PPDB en realidad se deban a un resultado atribuible a una respuesta de reacción cruzada por la semejanza de los antígenos PPDA y PPDB. Sin embargo, sólo 2 animales mostraron una fuerte producción de IFN-γ por uso de ESAT6:CFP10 lo que podría indicar la alta probabilidad de detectar animales realmente infectados por *M. bovis* por los antígenos ESAT6:CFP10 demostrando su especificidad aún en zonas de baja prevalencia.

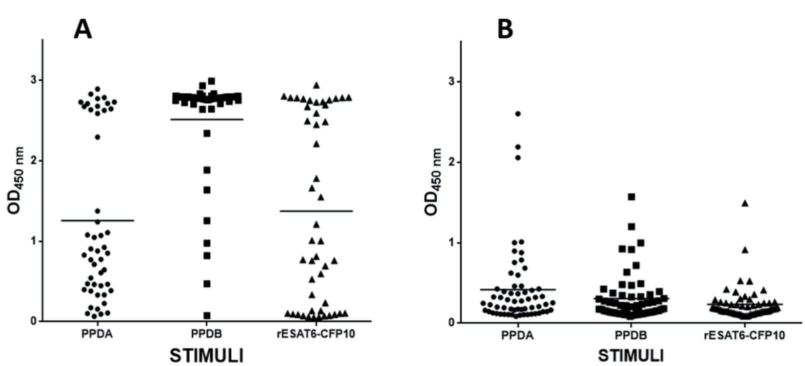


Fig. 3. Medición de la estimulación de IFN-γ en cultivos de sangre de bovino. Se obtuvieron muestras de sangre de ganado de la vena caudal y se estimularon durante 18 h con PPDB, PPDA o ESAT6:CFP10 recombinante de forma independiente. Se midió la producción de IFN-γ bovino por su absorbancia mediante la prueba de ELISA. (A) Muestras de animales de rebaños con una alta prevalencia de infección (>20%), y (B) con una baja prevalencia de infección (<2%) (tomada de Gutiérrez-Ortega et al., 2021).

4 I DISCUSIÓN

La ingeniería de traducción y la bioinformática han permitido acelerar la velocidad a la que se pueden generar nuevas moléculas con fines diagnósticos usando proteínas híbridas multi-epítopo. Entre las proteínas antigénicas más reconocidas para mejorar el diagnóstico

de la TB destacan las proteínas ESAT6 y CFP10, sin embargo, su producción usando cultivos de micobacterias es de alto riesgo, lento y además con muy bajos rendimientos debido a que sólo se producen durante la etapa infecciosa de *M. tuberculosis*.

Mediante las nuevas técnicas genómicas y biotecnológicas innovadoras se ha logrado un significativo progreso en el diseño y desarrollo más eficiente de nuevos antígenos contra la TB debido al conocimiento del genoma completo de *Mtb*. Estas herramientas han demostrado el potencial para identificar nuevos biomarcadores de la infección tuberculosa, acelerando la selección de las mejores mezclas antigénicas con el mayor potencial para la caracterización de la respuesta inmune asociada a la infección del huésped con fines diagnósticos e inmunizantes (Coppola y Ottenhoff, 2018). Algunos de los nuevos reactivos biológicos contemplan proteínas individuales o mezclas de ellas, complejos de proteínas multi-epítopo o fragmentos de proteínas como péptidos antigénicos, los cuales se han analizado mediante las pruebas de diagnóstico de rutina como la prueba intradérmica TST y la prueba complementaria basada en ELISA para la medición del IFN-γ para tratar de aumentar su sensibilidad de la prueba de la TB. En este sentido, se ha llegado a prestar una especial atención en las proteínas ESAT6, CFP10, EspC, MPB70 y MPB83 tanto en pruebas serológicas para detectar anticuerpos específicos o en ensayos de inducción de la respuesta inmune de tipo celular como la prueba ELISA del IFN-γ.

El sistema de expresión de *E. coli* es una herramienta muy utilizada para obtener proteínas heterólogas recombinantes seleccionadas y modificadas para fines de diagnóstico, incluidas las de origen micobacteriano. Las proteínas ESAT6 y CFP10 recombinantes tienden a agregarse debido a su naturaleza hidrofóbica por su alto contenido de estructuras secundarias de alfa hélice, por lo que se ha tratado de optimizar su producción en *E. coli* mediante nuevas plataformas de síntesis artificial. Algunas estrategias biotecnológicas para mejorar la expresión genética en *E. coli* incluyen inserciones de promotores con tediosos pasos de clonación. La ingeniería de traducción y la sobreexpresión de proteínas a escala en *E. coli* se pueden lograr mediante el diseño basado en tecnología genética que puede alterar las secuencias de genes recombinantes mediante la optimización del uso de codones.

En este trabajo, logramos obtener un método molecular de obtención artificial de los dos principales antígenos micobacterianos ESAT6 y CFP10 mediante una sola proteína híbrida usando un algoritmo de optimización de codones de la secuencia genética. Se obtuvo una proteína con buenos rendimientos conservando sus propiedades antigénicas y de diagnóstico favoreciendo su solubilidad, lo que confirma que la generación de secuencias genéticas sintéticas con la optimización de codones, puede ser una herramienta viable y rentable para la obtención de biomarcadores de procesos infecciosos. Los resultados obtenidos confirman que la molécula híbrida ESAT6:CFP10 tiene un fuerte potencial como reactivo biológico de diagnóstico de la TB como lo han propuesto otros grupos de investigación usando las proteínas nativas de forma individual (van Pinxteren et al., 2000).

Además, demostramos en el modelo natural de la infección tuberculosa en animales que la molécula sintética de ESAT6:CFP10 es en estructura y función compatible con el reconocimiento de la respuesta inmune adaptativa de los individuos con una infección activa, como se ha observado en otros estudios en modelos de laboratorio usando moléculas sintéticas a diseño para el rastreo de la TB (Tsolaki et al., 2013), y donde se utilizó a *Mycobacterium smegmatis* como biofábrica con menores rendimientos de la proteína (5 mg/L), muy inferiores a los logrados utilizando la plataforma optimizada en *E. coli*. Otro sistema de expresión recombinante más sofisticado para los antígenos de fusión del complejo *M. tuberculosis* se reportó usando hojas de *Nicotiana* (Saba et al., 2019), sin embargo, el sistema de transformación y manipulación de células vegetales coloca en mucha desventaja estratégica este sistema de producción masiva de biológicos de interés biotecnológico. Por lo tanto, utilizando la plataforma de optimización de codones para cambiar los parámetros que son fundamentales para mejorar la eficiencia de la expresión, traducción y producción de ESAT6:CFP10 en *E. coli,* junto con los bajos costos del método de purificación utilizado en este sistema bacteriano, los rendimientos obtenidos a un costo muy bajo lo hace una elección muy atractiva para aumentar la producción de esta y otras moléculas antigénicas híbridas con fines inmunológicos, lo que representa una opción muy rentable para desarrollar biológicos de próxima generación. Los antígenos de fusión también se han utilizado para generar anticuerpos policlonales multivalentes para detectar a los sospechosos con una infección mediante pruebas serológicas (Dai et al., 2017).

CONCLUSIÓN

La proteína de fusión ESAT6:CFP10 lograda a diseño molecular después de un ajuste para optimizar el uso de codones se obtuvo de forma muy eficiente como un antígeno soluble para ser evaluado como una molécula inmunoestimulante en cultivos de sangre completa de individuos infectados. Los resultados indicaron que la proteína de fusión es una molécula inmunocompetente que podría complementar y potenciar el diagnóstico de las infecciones por el grupo de bacterias del complejo *Mtb* incluyendo los patógenos humanos y bovinos dada la gran similitud de las respuestas inmunes contra la infección tuberculosa en ambos huéspedes. Además, la proteína de fusión ESAT6:CFP10 podría ser muy útil para complementar protocolos de inmunización molecular en esquemas de vacunación de nueva generación, muy probablemente como una molécula subunitaria de refuerzo, abriendo toda una línea de investigación aplicada en el campo biofarmacéutico.

REFERENCIAS

Adesokan, H.K., Akinseye, V.O., Streicher, E.M., Van Helden, P., Warren, R.M., Cadmus, S.I., 2019. Reverse zoonotic tuberculosis transmission from an emerging Uganda I strain between pastoralists and cattle in South-Eastern Nigeria. BMC Vet. Res. 15, 437.

Andersson, S.G.E., Sharp, P.M., 1996. Codon usage in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiology 142, 915–925.

Barrios-Payán, J.A., Castañón-Arreola, M., Flores-Valdez, M.A., Hernández-Pando, R., 2010. Aspectos biológicos, clínicos y epidemiológicos de la tuberculosis latente. Sal. Pub. Mex. 52, 70-78.

Coppola, M., Ottenhoff, T.H.M., 2018. Genome wide approaches discover novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens as correlates of infection, disease, immunity and targets for vaccination. Semin. Immunol. 39, 88–101.

Dai, Z., Liu, Z., Xiu, B., Yang, X., Zhao, P., Zhang, X., Duan, C., Que, H., Zhang, H., Feng, X., 2017. A multiple-antigen detection assay for tuberculosis diagnosis based on broadly reactive polyclonal antibodies. Iran. J. Basic Med. Sci. 20, 360–367.

Davy, A.M., Kildegaard, H.F., Andersen, M.R., 2017. Cell factory engineering. Cell. Syst. 4, 262–275.

Devi, K.R., Lee, L.J., Yan, L.T., Syafinaz, A.N., Rosnah, I., Chin, V.K., 2021. Occupational exposure and challenges in tackling *M. bovis* at human-animal interface: a narrative review. Int. Arch. Occup. Environ. Health. 2021, 1–25.

Gutiérrez-Ortega, A., Moreno, D.A., Ferrari, S.A., Espinosa-Andrews, H., Ortíz, E.P., Milián-Suazo, F., Alvarez, A.H., 2021. High-yield production o f major T-cell ESAT6-CFP10 fusion antigen of *M. tuberculosis* complex employing codon-optimized synthetic gene. Int. J. Biol. Macromol. 171, 82–88.

Hatfield, G.W., Roth, D.A., Optimizing scaleup yield for protein production: computationally optimized DNA assembly (CODA) and translation engineering. Biotechnol. Ann. Rev. 13, 27–42.

Kock, R., Michel, A.L., Yeboah-Manu, D., Azhar, E.I., Torrelles, J.B., Cadmus, S.I., Brunton, L., Chakaya, J.M., Marais, B., Mboera, L., Rahim, Z., Haider, N., Zumla, A., 2021. Zoonotic Tuberculosis - The changing landscape. Int. J. Infect. Dis. S1201-9712(21)00177-6.

Kulshrestha, A., Gupta, A., Verma, N., Sharma, S.K., Tyagi, A.K., Chaudhary, V.K., 2005. Expression and purification of recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis* for application in serodiagnosis. Protein Expr. Purif. 44, 75–85.

Liu, L., Yang, H., Shin, H.D., Chen, R.R., Li, J., Du,G., et al. (2013). How to achieve high-level expression of microbial enzymes: strategies and perspectives. Bioengineered 4, 212–223.

Lombard, J.E., Patton, E.A., Gibbons-Burgener, S.N., Klos, R.F., Tans-Kersten, J.L., Carlson, B.W., Keller, S.J., Pritschet, D.J., Rollo, S., Dutcher, T.V., Young, C.A., Hench, W.C., Thacker, T.C., Perea, C., Lehmkuhl, A.D., Robbe-Austerman, S., 2021. Human-to-cattle *Mycobacterium tuberculosis* complex transmission in the United States. Front. Vet. Sci. 8, 691192.

Mahairas, G.G., Sabo, P.J., Hickey, M.J., Singh, D.C., Stover, C.K., 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. J. Bacteriol. 178, 1274-128.

Nieuwkoop, T., Claassens, N.J., van der Ooost, J., 2019. Improved protein production and codon optimization analysis in *Escherichia coli* by bicistronic design. Microb. Biotechnol. 12, 173–179.

Restrepo-Pineda, S., Bando-Campos, C.G., Valdez-Cruz, N.A., Trujillo-Roldán, M.A., 2019. Recombinant production of ESAT-6 antigen in thermoinducible *Escherichia coli*: the role of culture scale and temperature on metabolic response, expression of chaperones, and architecture of inclusion bodies, Cell Stress Chaperones 24, 777–792.

Rodwell, T.C., Kapasi, A.J., Moore, M., Milian-Suazo, F., Harris, B., Guerrero, L.P., Moser, K., Strathdee, S.A., Garfein, R.S., 2010. Tracing the origins of *Mycobacterium bovis* tuberculosis in humans in the USA to cattle in Mexico using spoligotyping. Int. J. Infect. Dis. 3, e129-35.

Saba, K., Gottschamel, J., Younus, I., Syed, T., Gull, K., Günter Lössl, A., Mirza, B., Tahir Waheed, M., 2019. Chloroplast-based inducible expression of ESAT-6 antigen for development of a plant-based vaccine against tuberculosis. J. Biotechnol. 305, 1–10.

Tsolaki, A.G., Nagy, J., Laiva, S., Kishore, U., Rosenkrands, I., Robertson, B.D., 2013. *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85B and ESAT-6 expressed as a recombinant fusion protein in *Mycobacterium smegmatis* elicits cell-mediated immune response in a murine vaccination model. Mol. Immunol. 54, 278–283.

van Pinxteren, L.A.H., Ravn, P., Agger, E.M., Pollock, J., Andersen, P., 2000. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7, 155-160.

Wahdan, A., Riad, E.M., Enany, S., 2020. Genetic differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* isolated from cattle and human sources in, Egypt (Suez Canal area). Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 73, 101553.

ANÁLISIS GENÓMICO EN LA IDENTIFICACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE CARIES DENTAL

Data de aceite: 04/07/2023

Juan Carlos Santiago-Jiménez
Escuela Superior de Física y Matemáticas,
Instituto Politécnico Nacional.
Ciudad de México.

Ricardo Godínez-Aguilar
Ciudad de México, Ciudad de México.

Krisselby Ivonne Jiménez-Santiago
Academia de Electromecánica, Instituto
Tecnológico Superior de la Región Sierra.
Carretera Francisco Javier Mina, Tabasco.

Gabriel Ramírez-Damaso
Escuela Superior de Física y Matemáticas,
Instituto Politécnico Nacional.
Ciudad de México.

Fray de Landa Alvarado-Castillo
Escuela Superior de Física y Matemáticas,
Instituto Politécnico Nacional.
Ciudad de México.

RESUMEN: La caries dental (CIE-10 K02 Caries dental) es una enfermedad infecciosa oral multifactorial que provoca la destrucción de los órganos dentarios, la cual puede ser detenida en sus primeras etapas. Se han definido múltiples factores de riesgo en el proceso de aparición y desarrollo de caries, como el alto consumo en la dieta de hidratos de carbono, capacidad de amortiguamiento de la saliva, falta de higiene bucal e incluso se ha relacionado con factores genéticos y la presencia de ciertas patologías crónicas como el asma y obesidad entre otras. En el último reporte del año 2022 de la organización mundial de la salud (OMS) calculan que casi la mitad de la población mundial (45% o 3,5 mil millones de personas) padece de enfermedades bucodentales, los casos mundiales de enfermedades bucodentales han aumentado unos mil millones durante los últimos 30 años. En años recientes se ha reportado diversos genes que posiblemente estén relacionados con la caries dental, sin embargo, estos reportes se han dado de manera aislada y no se ha realizado un análisis genómico que muestre una correlación significativa, por ello nos propusimos realizar una investigación con un enfoque genómico para identificar un conjunto de genes potenciales relacionados, tanto de factores predisponentes, como de factores protectores. Se realizó un análisis *in silico* mediante algoritmos bioinformáticos basado en minería de datos automatizada en la base de datos del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) de genes candidatos

implicados en el desarrollo caries dental, aquellos que codifican para proteínas que participan en la formación del esmalte dental, factores de protección presentes en la saliva y genes implicados en la respuesta inmune del huésped, así como el número de mutaciones de sentido equivocado SNP (Polimorfismo de Nucleótido Simple), se validaron mediante FunRich (http://funrich.org/) demostrando que existe una alta correlación con el fenotipo clínico de caries dental. Se identificaron 16 genes candidatos a ser marcadores de riesgo de caries. Las mutaciones pueden ser de relevancia ya que la proteína traducida de estas variantes pudiera tener cambios en su conformación, actividad y/o funcionalidad. Los cambios genéticos que se puedan encontrar en estos genes también pueden sugerir posibles interacciones dinámicas entre múltiples proteínas que nos arrojarían la variabilidad fenotípica en la historia natural de la caries dental.
PALABRAS CLAVES: Caries dental, marcadores genómicos y proteómicos, susceptibilidad, mutaciones, algoritmos bioinformáticos.
ÁREAS TEMÁTICAS: Caries dental, marcadores genómicos y proteómicos, algoritmos bioinformáticos.

ABSTRACT: Dental caries (ICD-10 K02 Dental caries) is a multifactorial oral infectious disease that causes the destruction of the dental organs, which can be stopped in its early stages. Multiple risk factors have been defined in the process of appearance and development of caries, such as high consumption of carbohydrates in the diet, buffering capacity of saliva, lack of oral hygiene, and it has even been related to genetic factors and the presence of certain chronic diseases such as asthma and obesity among others. In the last report of the year 2022 of the World Health Organization (WHO) they calculate that almost half of the world population (45% or 3.5 billion people) suffers from oral diseases, global cases of oral diseases have increased by about a billion over the last 30 years. In recent years, various genes have been reported that are possibly related to dental caries, however, these reports have been given in an isolated manner and a genomic analysis has not been carried out that shows a significant correlation, for this reason we set out to carry out an investigation with a genomic approach to identify a set of potential related genes, both predisposing factors and protective factors. An in silico analysis was performed using bioinformatic algorithms based on automated data mining on the National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) database of candidate genes involved in caries development dental, those that code for proteins that participate in the formation of tooth enamel, protection factors present in saliva and genes involved in the host's immune response, as well as the number of SNP (Simple Nucleotide Polymorphism) missense mutations, were validated by FunRich (http://funrich.org/) demonstrating that there is a high correlation with the clinical phenotype of dental caries. 16 candidate genes to be caries risk markers were identified. The mutations may be relevant since the protein translated from these variants could have changes in its conformation, activity and/or functionality. The genetic changes that can be found in these genes can also suggest possible dynamic interactions between multiple proteins that would give us the phenotypic variability in the natural history of dental caries.
KEY WORDS: Dental caries, genomic and proteomic markers, susceptibility, mutations, bioinformatic algorithms.
THEMATIC AREAS: Dental caries, genomic and proteomic markers, bioinformatics algorithms.

INTRODUCCIÓN

La caries dental (CIE-10 K02 Caries dental) [1] es una enfermedad infecciosa oral multifactorial que provoca la destrucción de los órganos dentarios, la cual puede ser detenida en sus primeras etapas [2,3]. Se han definido múltiples factores de riesgo en el proceso de aparición y desarrollo de caries, como el alto consumo en la dieta de hidratos de carbono, capacidad de amortiguamiento de la saliva, falta de higiene bucal e incluso se ha relacionado con factores genéticos y la presencia de ciertas patologías crónicas como el asma y obesidad, además de las condiciones socio-económicas más bajas, es ampliamente aceptado que la ocurrencia de caries depende de factores ambientales y del hospedero [3,4,5,6,7,8]. En el último reporte del año 2022 de la organización mundial de la salud (OMS) calculan que casi la mitad de la población mundial (45% o 3,5 mil millones de personas) padece enfermedades bucodentales, los casos mundiales de enfermedades bucodentales han aumentado unos mil millones durante los últimos 30 años, mientras que en el año 2007 aproximadamente 2430 millones de personas tenían caries dental en los dientes permanentes, representando el 36% de la población mundial, con respecto a los dientes de leche se calcula que afecta a unos 620 millones de personas (9% de la población mundial) [9, 10]. En años recientes se ha reportado diversos genes que posiblemente estén relacionados con la caries dental, sin embargo, se han dado de manera aislada [11, 12, 13,14] y se requiere un análisis genómico integral. Por ello, el realizarlo permitirá identificar genes potenciales relacionados, tanto de factores predisponentes, como de factores protectores.

OBJETIVOS

Los objetivos de esta investigación fue el análisis genómico de un conjunto de genes y su correlación significativa, así como, posibles candidatos a ser marcadores genómicos y proteómicos que predisponen a la susceptibilidad de padecer la enfermedad de caries dental.

METODOLOGÍA

Se realizó un análisis *in silico* mediante algoritmos bioinformático basado en minería de datos automatizada en la base de datos del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) de genes candidatos implicados en el desarrollo caries dental, aquellos que codifican para proteínas que participan en la formación del esmalte dental, factores de protección presentes en la saliva y genes implicados en la respuesta inmune del huésped, así como el número de mutaciones de sentido equivocado SNP (Polimorfismo de Nucleótido Simple), a continuación con los genes y proteínas identificadas se construyó un interactoma con la herramienta de búsqueda para

la recuperación de interacciones de genes/proteínas STRING 10 (http://string-db.org/), se consideraron imágenes de proteínas cristalizadas (http://www.rcsb.org/pdb), así como imágenes de los modelos de proteínas (http://swissmodel.expasy.org/). La puntuación de confianza que se utilizo fue la más alta de -95% que corresponde a la probabilidad aproximada de que existe una relación predicha entre dos proteínas en el mismo mapa metabólico en la base de datos KEGG (Enciclopedia de Genes y Genomas Kioto http://www.genome.jp/kegg/), además se validaron con los procesos biológicos contenidos en KEGG y GO (Ontología de genes http://geneontology.org/).

RESULTADOS

Se identificaron 16 genes candidatos a ser marcadores de riesgo de caries, entre los que se encuentran genes que se expresan en el desarrollo dentario y genes de protección contra las infecciones. Esta información se sistematizo en la Tabla 1 que incluyen el número de mutaciones de sentido equivocado que se han reportado hasta ahora. En los interactomas construidos para genes, resaltan los genes del enriquecimiento por proceso biológico mediante GO de odontogénesis, resultando 6 candidatos altamente relacionados se muestran en rojo en la Figura 1. En los interactomas construidos para proteínas, se corroboro algunas proteínas reportadas por otros investigadores de manera experimental como RPS6KA2 y PTK2B, así como el proponer 10 proteínas no reportadas anteriormente, como son: BCAR1, PXN, SRC, MASP1, MASP2, FYN, CREB1, PTPN11, MAPK1, y TGFB III, las cuales en su mayoría participan en vías de señalización, los cuales se muestran en la Figura 2.

Nombre oficial del gen	Símbolo oficial del gen	ID del gen	Localización cromosómica	No., de mutaciones SNP	Función biológica.
Ameloblastin (enamel matrix protein)	AMBN	258	4q13.3	39	Proteína importante para la formación de la matriz del esmalte y su mineralización. Mutaciones en este gen están asociadas a amelogénesis imperfecta.
Amelogenin, X - linked	AMELX	265	4q13.3	4	Amelogeninas involucradas en biomineralización durante el desarrollo del esmalte dental. Mutaciones en este gen pueden causar amelogénesis imperfecta ligada al X.
Homo sapiens B-cell CLL/ lymphoma 11B	BCL11B	64919	4q32.2	15	Factor de transcripción necesario para la proliferación del epitelio labial que da origen a los ameloblastos a su vez suprime el desarrollo de ameloblastos en la cara lingual de los incisivos.
SLC2A2 solute carrier family 2 , member 2	SLC2A2	6514	3q26.1-q26.2	31	Transportador de glucosa integrado a la membrana plasmática, media y facilita el transporte bidireccional de glucosa. Por su baja afinidad, se ha sugerido como sensor de glucosa.
Kallikrein-related peptidase 4	KLK4 (EMSP1)	9622	19q13.41	20	Su expresión es similar a la proteína murina, participa en el desarrollo de los dientes degradando proteínas del esmalte dental.
Enamelin	ENAM	10117	4q13.3	86	El esmalte dental es la sustancia más dura encontrada en vertebrados. Enamelina es la proteína más grande en la matriz del esmalte. Está involucrada en la mineralización y organización estructural del esmalte. Mutaciones en este gen producen amelogénesis imperfecta tipo 1C.
Defensin beta 1	DEFB1	1672	8p23.1	26	Péptido antimicrobiano secretado por neutrófilos e implicado en la resistencia de superficies a la colonización microbiana. Este gen está implicado en la patogénesis de la fibrosis quística.
Statherin	STATH	6769	4q13.3	6	La estaterina en saliva humana inhibe tanto la precipitación de fosfato de calcio primaria y secundaria, uniéndose a la hidroxiapatita, asociado con una variedad de bacterias orales. Esta función es crucial en el mantenimiento de la integridad del esmalte.
Matrix metallo-peptidase 13	MMP13	4322	11q22.3	42	Proteína de la familia de las metaloproteinasas. Implicadas en la degradación de matriz extracelular en procesos normales.

Matrix metallo-peptidase 20	MMP20	9313	11q22.3	51	Proteína de la familia de las metaloproteinasas. Implicadas en la degradación de matriz extracelular en procesos normales. Esta proteína degrada amelogenina, el mayor componente de la matriz del esmalte dental. Mutaciones en este gen resultan en la terminación prematura de la traducción del este gen, y ha sido asociado a amelogénesis imperfecta.
Mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble	MBL2	4153	10q11.2	34	Gen que codifica para una lectina de unión a manosa encontrada en suero. Es un elemento importante del sistema de inmunidad innata. Esta proteína reconoce manosa y N-acetilglucosamina de muchos microorganismos, siendo capaz de activar la vía del complemento. Deficiencias en este gen han sido asociadas a susceptibilidad a enfermedades autoinmunes e infecciosas.
Taste receptor, type 1, member 2	TAS1R2	80834	1p36.13	87	El receptor de sabor dulce es miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G que detectan moléculas dulces.
Tuftelin 1	TUFT1	7286	1q21	32	Proteína que juaga un papel importante en el desarrollo y mineralización del esmalte dental.
Dermcidin	DCD	117159	12q13.1	12	Proteína esta constitutivamente expresada en sudor y posee actividad antibacteriana y antimicótica.
Cystatin S	CST4	1472	20q11.21	24	Gen que codifica para un inhibidor cisteina-peptidasa tipo 2 en saliva. Se ha observado actividad antibacteriana y antiviral, consistentes con una función protectora.
Collagen, type VII, alpha 1	COL7A1	1294	3q21.1	294	Funciona como fibra de anclaje en la membrana basal de epitelio escamoso estratificado. Mutaciones en este gen se asocian a todas las formas de epidermólisis bullosa. Se sugiere que colágeno 7 regula la diferenciación de ameloblastos y es esencial para la formación de procesos de Tomes en los dientes.

Tabla 1. Genes candidatos a ser marcadores de riesgo asociado al desarrollo de caries dental.

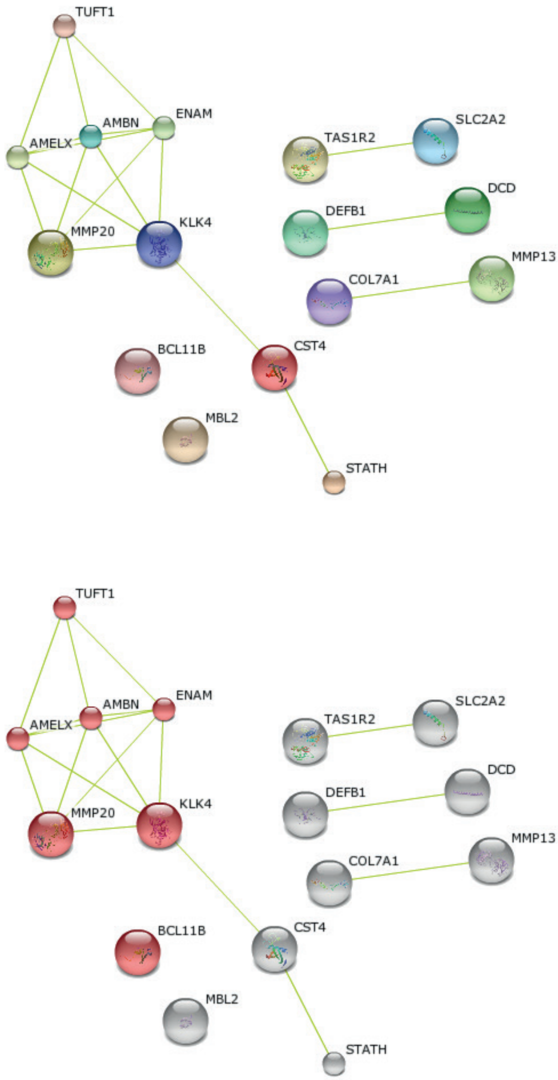


Figura 1. Interactoma de genes candidatos a ser considerados como Biomarcadores.

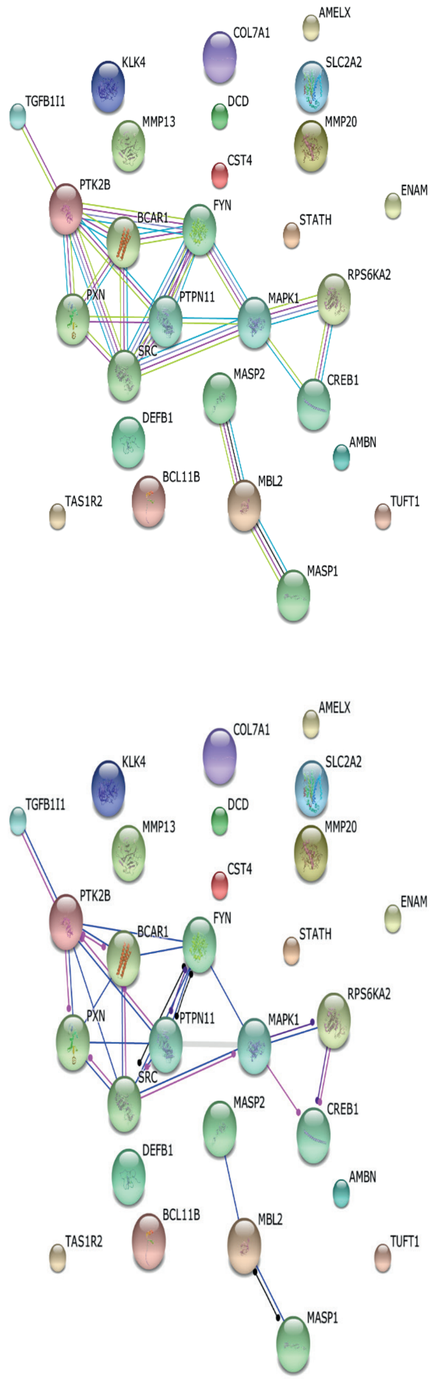


Figura 2. Interactoma de proteínas candidatas a ser consideradas como Biomarcadores.

CONCLUSIONES

Estos análisis bioinformáticos de las mutaciones presentes en genes, son de relevancia ya que la proteína traducida de estas variantes pudiera tener cambios en su conformación, actividad y/o funcionalidad. Los cambios genéticos que se puedan encontrar en estos genes también pueden sugerir posibles interacciones dinámicas entre múltiples proteínas que nos arrojarían la variabilidad fenotípica en la historia natural de la caries dental. La secuenciación masiva de genomas completos, además de la cantidad y generación de información científica obliga al investigador a integrar y analizar desde una perspectiva global integradora de sistemas la información que se genera de manera reducida por la necesidad de controlar las variables al aplicar el método científico, es por ello que métodos de investigación como la bioinformática permiten descubrir lo que se encuentra escondido en este universo de información contenida en bases de datos. Se proponen 6 genes y 10 proteínas como posibles biomarcadores para detectar anticipadamente la predisposición a sufrir la enfermedad de caries dental.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ICD-10-CM Official Guidelines for Coding (2023). Reporting. Recuperado: https://www.cdc.gov/nchs/index.htm (Consultado: 21/05/23).

2. Aubrey Sheiham. (2005). Bulletin of the World Health Organization, Oral health, general health and quality of life. Volume 83: 2005 Volume 83, Number 9, September 2005, 641-720.

3. Vázquez-Rodríguez A. et al. (2011). Prevalence of dental caries, asthma and obesity: short analysis of its relationship. Electronic Journal Medicine, Health and Society. I (2):1-15.

4. Keyes, P. H. (1960). The infectious and transmissible nature of experimental dental caries: findings and implications. Archives of Oral Biology, 1. 304.

5. Evans RW, Lo EC, Darvell. (1993). Determinants of variation in dental caries experience in primary teeth of Hong Kong children aged 6-8 years. BW Community Dent Oral Epidemiol. Feb; 21(1):1-3.

6. Featherstone JD. (2004).The continuum of dental caries-evidence for a dynamic disease process. J Dent Res. 2004; 83 Spec No C: C39-42.

7. Duckworth RM (1993). The science behind caries prevention. Int Dent J. 1993 Dec; 43(6 Suppl 1):529-39.

8. Peres KG., et al. (2009) Social and dental status along the life course and oral health impacts in adolescents: a population-based birth cohort. Health and Quality of Life Outcomes; 7:95.

9. Bratthall D. et al. (2007). Disease Control Priorities in Developing Countries 2007; Cap 38: Table 38.1.

10. World Health Organization (2023). La OMS destaca que el descuido de la salud bucodental afecta a casi la mitad de la población mundial. Comunicado. Recuperado: https://www.who.int/es/news/item/18-11-2022-who-highlights-oral-health-neglect-affecting-nearly-half-of-the-world-s-population (Consultado: 21/05/23).

11. Wang X. et al. (2012). Genome-wide association scan of dental caries in the permanent dentition. BMC Oral Health. Dec 21; 12:57.

12. Qiong Zhou., et al. (2023). Impact of maternal caries risk on children's caries susceptibility. Shanghai Journal of Stomatology. Feb 32(1):63-68.

13. Rania Al-Mahdi., et al. (2023). Associations of the activity and concentration of carbonic anhydrase VI with susceptibility to dental caries: A systematic review and meta-analysis. Clin Exp Dent Res. Apr; 9 (2): 358-367.

14. Daniela Gachova et al. (2023). Polymorphisms in genes expressed during amelogenesis and their association with dental caries: a case-control study. Clin Oral Investig. Apr; 27 (4): 1681-1695.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS PRELIMINARES EN LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD QUIMIOTERAPÉUTICA DE BETA-SITOSTEROL EN UN MODELO DE OSTEOSARCOMA EN RATAS

Data de aceite: 04/07/2023

Rogelio Paniagua Pérez
Servicio de Bioquímica, Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII

Franco y Bourland Rebecca E.
Servicio de Bioquímica, Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII

Eduardo Madrigal Bujaidar
Laboratorio de Genética, ENCB, Instituto Politécnico Nacional

Isela Álvarez González
Laboratorio de Genética, ENCB, Instituto Politécnico Nacional

Victor M. Araujo Monsalvo
Servicio de Biomecánica, Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII

Victor M. Domínguez Hernández
Servicio de Bioquímica, Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII

Carlos J. Martínez Canseco
Servicio de Bioquímica, Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII

Raúl Pichardo Bahena
Servicio de Patología, Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII

Hiram García Campillo
Bioterio, Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII

Lidia Cruz Hernández
Servicio de Bioquímica, Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII

Alejandra Quintana Armenta
Servicio de Bioquímica, Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII

Lidia Ruíz Rosano
Servicio de Bioquímica, Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII

Elisa Martínez Coria
Servicio de Tomografía, Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII

Martín Luna Méndez
Servicio de Tomografía, Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII

RESUMEN: El osteosarcoma (OS) es un tumor maligno de hueso, constituye el 75% en pacientes jóvenes, afecta principalmente huesos de las extremidades inferiores. No existe ningún método eficaz para prevenir este tipo de cáncer y puede inducir la amputación. El beta-sitosterol (BS) es un compuesto vegetal. Estudios han demostrado propiedades biomédicas inmunomoduladoras, antimutagénicas,

antiinflamatorias y antioxidantes. El benzopireno (BZP) es un hidrocarburo, capaz de inducir OS. Considerando estos antecedentes, se planteó este proyecto de investigación. Por lo que el objetivo fue determinar en un modelo de carcinogénesis ósea en ratas, la actividad quimioterapéutica de beta-sitosterol en el desarrollo del osteosarcoma. Se indujeron lesiones neoplásicas mediante la administración perifemoral de BZP. De la 7ª a la 9ª semana se administró por vía oral BS. Se registró el peso de las ratas, se tomaron muestras sanguíneas para realizar estudios de genotoxicidad; se realizaron pruebas bioquímicas mediante para determinar velocidad de sedimentación (VSG), fosfatasa alcalina (FA) y deshidrogenasa láctica (DHL). Al cumplir la novena semana, se realizó eutanasia, se extrajeron los fémures, tibias, hígado y pulmones para su estudio histopatológico.
PALABRAS CLAVE: Osteosarcoma, Benzopireno, beta-sitosterol, quimioterapéutico, Murine model.

ABSTRACT: Osteosarcoma (OS) is a malignant bone tumor, constitutes 75% in young patients, mainly affects bones of the lower extremities. There is no effective method to prevent this type of cancer, and it can lead to amputation. Beta-sitosterol (BS) is a plant compound. Studies have shown immunomodulatory, antimutagenic, anti-inflammatory, and antioxidant biomedical properties of this compound. Benzopyrene (BZP) is a hydrocarbon, capable of inducing OS. Considering this background, this research project was raised. Therefore, the objective was to determine, in a model of bone carcinogenesis in rats, the chemotherapeutic activity of beta-sitosterol in the development of osteosarcoma. Neoplastic lesions were induced by perifemoral administration of BZP. From the 7th to the 9th week BS was administered orally. The weight of the rats was recorded, blood samples were taken for genotoxicity studies; biochemical tests were performed to determine sedimentation rate (ESR), alkaline phosphatase (FA) and lactic dehydrogenase (DHL). At the ninth week, euthanasia was performed, femurs, tibiae, liver and lungs were removed for histopathological study. Preliminary results show a chemoprotective activity of betasitsoterol in the animals studied. The activity in Sprague Dawley rats being more evident compared to the results in Wistar rats.
KEYWORDS: Osteosarcoma, Benzopyrene, beta-sitosterol, chemotherapeutic, Murine model.

INTRODUCCIÓN

El osteosarcoma es una neoplasia maligna primaria, derivada del mesénquima óseo y típicamente forma tejido osteoide o hueso inmaduro. Suele ocurrir durante la adolescencia, durante la etapa de crecimiento. Es el tumor primario de hueso sólido más común [1] y constituye aproximadamente el 20 % de los sarcomas óseos primarios (American Cancer Society, 2018). Cada año se diagnostican entre 400 y 1000 casos nuevos en Estados Unidos [2,3], lo que supone una incidencia de 8/1.000.000 en la población general. Se considera una enfermedad juvenil ya que 7,5 de cada 10 casos aparecen en pacientes menores de 25 años [4]. La mayoría de los casos en pacientes mayores son sarcomas secundarios, es decir, sarcomas que surgen como complicación de enfermedades óseas preexistentes (enfermedad de Paget, osteomielitis crónica, infartos óseos crónicos) o

en tejidos previamente irradiados. Es uno de los pocos tumores que comienzan en los huesos y hacen metástasis a otras partes del cuerpo [5]. El osteosarcoma es considerado un complejo de resistencia a los tratamientos convencionales. Actualmente no existe un método eficaz para prevenir este tipo de cáncer. El tratamiento del osteosarcoma incluye quimioterapia, seguida de cirugía (amputación o cirugía de rescate) y quimioterapia posquirúrgica. A pesar de los avances significativos en el tratamiento del osteosarcoma, el pronóstico de los pacientes con metástasis sigue siendo malo, con una supervivencia general del 55 % después de la cirugía y la quimioterapia intensiva [6,7].

MODELOS ANIMALES

Los modelos animales utilizados en la investigación del tejido óseo son tan diversos como los materiales y las estrategias de reparación. Generalmente, y como en otras áreas de la ciencia, los estudios en animales se inician en modelos como el ratón o la rata, seguidos de conejos, cerdos y ovejas. La mayoría de los estudios se centran en animales medianos y grandes, debido a que la cirugía es compleja y requiere de un área grande para ser realizada y los resultados obtenidos en estos casos son más fácilmente extrapolables a un posible uso clínico. En cuanto a los modelos de lesión del tejido musculoesquelético, se utilizan tanto modelos de lesión crítica (lesiones que no se reparan espontáneamente) como modelos no críticos (lesiones que curan espontáneamente) [8]. La localización anatómica de estos defectos depende del objetivo del estudio. En este sentido, las más comunes son las lesiones y osteotomías en huesos largos (fémur, tibia, húmero y radio), cráneo, lesiones lumbares y lesiones en la región maxilofacial. Existe cierta controversia al comparar los resultados obtenidos en diferentes modelos animales. Esto se debe a que, en algunos casos, los compuestos que parecen funcionar en animales pequeños no funcionan en animales más grandes. Por ello, se considera de gran importancia la correcta elección del material de estudio, el tipo de lesión a realizar y el modelo animal elegido [9].

MODELOS DE INDUCCIÓN DE CÁNCER MURINO

Desde principios del siglo pasado hasta la actualidad, los modelos murinos han contribuido al conocimiento de la patogenia de muchas enfermedades y al desarrollo de nuevas terapias. La tendencia actual de la investigación biomédica sugiere que, en un futuro próximo, la disponibilidad de modelos murinos mejorará enormemente gracias al gran número de técnicas de manipulación genética y proyectos de mutagénesis química existentes. Por tanto, el uso de estos modelos será fundamental para el estudio funcional de las secuencias obtenidas a partir de los proyectos de secuenciación del genoma humano y murino [10,11]. El uso de modelos murinos se debe a que estos modelos ayudan en la comprensión de la patogénesis de muchas enfermedades y el desarrollo de terapias para reemplazar la función defectuosa de un gen dado. En medicina experimental, el roedor es

un organismo modelo que ofrece muchas ventajas frente a otros modelos genéticos como la mosca Drosophila, la mosca Caenorhabditis elegans benatode, entre otros [12,13].

Estas ventajas son:

- Al ser un mamífero, gran parte de sus procesos bioquímicos son similares aunque no idénticos a los humanos.
- Tienen un tiempo de gestación muy corto, son muy prolíficos y se adaptan fácilmente a la vida en bioterio, lo que permite controlar las variables ambientales en los experimentos.
- • Después de los humanos, son las especies más estudiadas desde el punto de vista genético
- Hay una gran cantidad de líneas definidas genéticamente, como líneas consanguíneas y congénitas, además de cientos de mutaciones y una gran cantidad de reordenamientos cromosómicos disponibles.
- Es el único animal que cuenta con sistemas eficientes para el cultivo de células embrionarias pluripotentes (células ES), lo que permite la realización de mutaciones dirigidas (ratones KO constitutivos y condicionales).

Algunos modelos reportados en la literatura para el desarrollo de OS son los siguientes: Se estableció un modelo animal para OS humano en hámsters dorados sirios recién nacidos, inyectando células OS humanas cultivadas adyacentes al fémur, todos los animales desarrollaron OS y metástasis pulmonares con una supervivencia de 36 días. media [8,14]. Otro modelo fue desarrollado con inyecciones intramedulares tibiales del virus del sarcoma murino de Moloney en tres cepas de ratas endogámicas neonatales, 10 días después presentaron tumores altamente malignos, produciendo mortalidad en todas las ratas tratadas [10]. Otro grupo de investigadores indujo OS con virus mediante la prueba de microtoxicidad de linfocitos, con inyección intratibial del virus del sarcoma murino de Moloney. El 73% de los animales inyectados progresaron a OS y causaron metástasis pulmonares con una supervivencia no superior a 2 meses [15]. Sin embargo, estos modelos tienen desventajas; la mortalidad es alta en cada uno de los modelos de benzopireno utilizados.

BENZOPIRENO

El benzopireno (BZP) es un hidrocarburo aromático policíclico (HAP) potencialmente cancerígeno. El alto contenido de BZP en algunos alimentos (frutos secos, embutidos, chorizo, especias, pizzas, pan de leña, carnes a la parrilla, café tostado) se debe a su proceso de elaboración que involucra procesos de combustión incompleta, también se puede encontrar en el tabaco. El BZP se produce por condensación de cinco anillos de benceno durante procesos de combustión a temperaturas de 300 a 600 °C. Desde 1775 los médicos británicos Pott y Hill, observaron alta incidencia de cáncer de escroto en el personal

encargado de la limpieza de chimeneas (chimney deshollinadores) [16]. Aproximadamente cien años después, se informaron hallazgos similares en Alemania y Escocia, entre trabajadores de la industria de alquitrán de hulla y parafina. Estas observaciones llevaron a la conclusión de que los derivados del petróleo y del carbón contenían sustancias capaces de inducir tumores. confirmado en 1918, cuando los investigadores japoneses Yamagiwa e Ichikawa demostraron que el alquitrán aplicado a la piel de los conejos inducía cáncer [17]. Hallazgos similares en ratas fueron documentados en 1920, en Inglaterra por Kennaway informado por Hugues. Sin embargo, dado que el alquitrán y el hollín son mezclas de varias sustancias y el aislamiento de los posibles compuestos químicos responsables de tales resultados era complejo, no fue hasta 1920 que se identificaron los HAP aislados del alquitrán como posibles responsables de producir tumores en la piel de ratones [18]. En 1931 se aisló del carbón uno de los HAP, el benzopireno (BZP), en el mismo año se sintetizó y se demostró que era el responsable de la producción de tumores cancerosos en animales de experimentación. También se encontró en alquitrán de hulla, alquitrán y hollín [19], uno de los primeros carcinógenos claramente identificados. En estudios epidemiológicos en trabajadores expuestos a hornos de coque, durante el proceso industrial de coquización del carbón, se encontró que las plantas de asfalto, fundiciones e instalaciones de aluminio tienen mayor índice de cáncer de pulmón que quienes no realizaban esas actividades laborales, lo que se atribuyó a la exposición a HAP [20]. Posteriormente, las investigaciones revelaron que también se encontraron PAH en alimentos consumidos por humanos [21]. BZP aparentemente actúa sobre el gen K-Ras, provocando una mutación en un área específica del gen que se puede cotejar en el ADN de pacientes con cáncer de pulmón. Este hallazgo no solo sirve para determinar que el tabaco es cancerígeno, sino que también puede ser útil para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas basadas en la información específica disponible para el ADN dañado por el cáncer [22].

BETA-SITOSTEROL

Es un fitosterol con estructura similar a la del colesterol de la grasa animal, se diferencia por la presencia de un grupo etil en la cadena lateral (figura 1). Todas las plantas, incluyendo las frutas, verduras, granos, especias y semillas poseen este compuesto. Los aceites de plantas son una fuente particularmente rica en beta-sitosterol, el cual se utiliza en el tratamiento de hipercolesterolemia, así como para modular la función inmune, la inflamación e interviene en el control de la producción de citocinas. La investigación también ha demostrado que el beta-sitosterol ayuda a normalizar la función de linfocitos T-cooperadores y células supresoras [23].

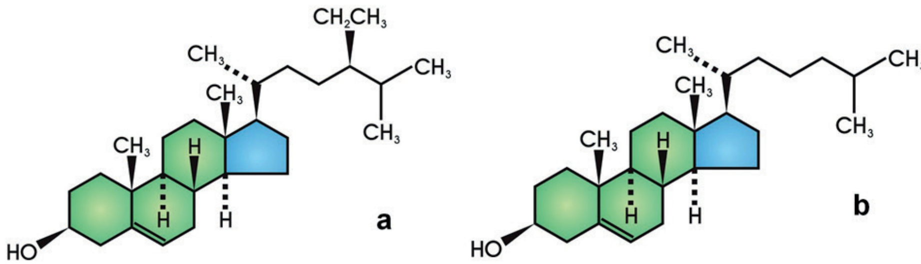


Figura 1. Estructura química de colesterol (a) y beta-sitosterol (b).

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales:

Se utilizaron 10 ratas macho Sprague Dawley y 10 ratas Wistar, donadas por el IMSS-Siglo XXI y el Instituto Nacional de Rehabilitación LGII Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, con un peso promedio de 180 g, divididas en 4 grupos y mantenidas en cajas de policarbonato. Las condiciones ambientales fueron: Período de luz/oscuridad de 12/12 horas; temperatura de 22 ± 2 °C y humedad relativa de 60-70%, con acceso libre a alimento (Rodent Lab Chow 5001, Purina) y agua. El procedimiento experimental fue aprobado por el Comité de Ética y Bioseguridad del Instituto Nacional de Rehabilitación LGII.

Reactivos

Beta-sitosterol, benzopireno, aceite mineral, dimetisulfóxido, ketamina, xilacina, isofluorano, colorante Giemsa y NaCl se adquirieron de Sigma Chemicals (St. Louis, MO, EE. UU.).

Inducción de OS con administración de BZP y BS

Las lesiones se indujeron mediante la administración perifemoral cada 24 horas durante 30 días a una dosis de 20 mg/kg de BZP (Sigma-Aldrich), disueltos en dimetilsulfóxido, el volumen de administración fue de 0,3 mL. A los grupos control negativo se les administró en la porción distal del fémur derecho en una inyección perifemoral y en tres puntos, una administración diaria de 0,3 ml de dimetilsulfóxido (vehículo de BZP) durante 30 días. 2 grupos experimentales (uno de ratas Sprague Dawley y otro de Ratas Wistar) a quienes se les administró en la porción distal del fémur derecho en inyección perifemoral y en tres puntos, una administración diaria de 20 mg/kg de BZP diluida en dimetilsulfóxido durante 30 días, posteriormente se les administró a los controles negativos aceite mineral VO y los grupos de tratamiento 200 mg/kg de beta-sitosterol durante 3 semanas, se les realizó

eutanasia al completar las 9 semanas a todos los animales para su estudio, se realizó evaluación morfológica y obtención de muestras de sangre.

Descripción de los procedimientos

1. Desde el día 0 se registró diariamente el peso de las ratas.
2. El día 0 y semanalmente hasta el final del estudio se obtuvieron muestras de sangre (dos gotas) de la punta de la cola haciendo un pequeño corte (1 mm), para realizar un frotis de sangre para estudios de genotoxicidad y citotoxicidad, mediante la prueba de micronúcleos.
3. Desde el final de la primera semana después de la manipulación farmacológica y hasta el sacrificio de las ratas, se evaluó el estado de los fémures tratados.
4. En la semana 0 y cada tres semanas se tomaron muestras de sangre (1 mL) de vena mandibular y/o retroorbitaria para determinar velocidad de sedimentación (método de Westergreen), proteína C reactiva (ELISA), fosfatasa alcalina y deshidrogenasa láctica (análisis colorimétrico).
5. Para los procedimientos en los que se requería sedación de los animales, se utilizó isofluorano colocado en un frasco de boca ancha, en el que se introducía al animal en estudio el tiempo necesario para que llegara a un estado sedado.

Después de la eutanasia y en el momento de la apertura quirúrgica del abdomen se realizó una evaluación macroscópica del estado orgánico de la rata, con especial atención al pulmón, hígado, riñón, bazo e intestino. Se extrajeron los fémures, tibias, pulmones e hígado y se lavaron con un amortiguador. Luego se colocaron en tampón de formalina al 10% y las muestras se fijaron y mantuvieron a 4°C hasta su estudio histológico.

Estudio histopatológico de fémur y tibia de rata

Una vez obtenidos los fémures y tibias de rata, cada muestra se lavó con un amortiguador, posteriormente se fijó en formalina tamponada al 10%, manteniéndolas toda la noche a una temperatura de 4 °C, durante 12 horas. Los fémures y las tibias se colocaron en una solución descalcificadora (ácido nítrico al 5% durante 96 horas). El hueso se neutralizó introduciéndolo en una solución de carbonato al 10%. solución y se lava con agua corriente durante 15 minutos. Las muestras se incluyeron en parafina. Las preparaciones histológicas se sumergieron en xilol para eliminar el exceso de parafina. Posteriormente, se realizaron cortes histológicos en un micrótomo rotatorio tipo Minot. El tejido se cortó hasta llegar a tejido intacto en rodajas de 5 micras, y luego se colocó con un cepillo en un baño de flotación. Las laminillas se marcaron con el número correspondiente a la muestra. Se realizó la selección y colocación del corte en la corredera. El exceso de agua se escurrió en las preparaciones histológicas y se fijó con calor (placa con termostato a 56-58 °C). El desparafinado de los cortes histológicos se realizó en estufa o estufa a

60°C por 30 min. Luego pasaron por una serie de alcoholes en concentración decreciente para rehidratar la muestra (100°, 95° y 70°). Se lavaron con agua para eliminar el exceso de alcohol. Se sumergieron en hematoxilina durante 10 minutos, se lavaron con agua para eliminar los excesos y se pasaron rápidamente por alcohol ácido. Se realizó nuevamente un lavado, se sumergieron por 30 segundos en eosina. Pasaron por otra serie de alcoholes, esta vez en orden creciente (70°, 95° y 100°). deshidratar la muestra, lograr el montaje con una cola no soluble en agua. Finalmente, se dejaron en remojo 10 minutos en xilol, antes de realizar el montaje final y observación al microscopio [15].

Estudio histopatológico de pulmón e hígado

Los órganos se colocaron en formalina al 10% durante 24 horas. Después de embeberlos en parafina, los tejidos se cortaron en rodajas de 2 a 4 mm de espesor. Se sumergieron en xilol para eliminar el exceso de parafina. Luego se sumergieron secuencialmente en alcohol de concentración decreciente para rehidratarlos (100°, 95° y 75°). Se lavaron con agua corriente para eliminar el exceso de alcohol, luego se sumergieron en hematoxilina durante 10 minutos, se lavaron con agua corriente, se pasaron rápidamente por alcohol ácido y finalmente se sumergieron en eosina durante 30 segundos. Luego se deshidrataron sumergiéndolos secuencialmente en alcohol cada vez más concentrado (75°, 95° y 100°). para ser montado en las láminas con cola no hidrofílica. Finalmente se empaparon con xilol durante 10 minutos antes de finalizar el montaje, y se observa en el microscopio [18].

Evaluación de genotoxicidad y citotoxicidad en sangre periférica mediante tinción de Giemsa,

Una vez obtenidas las muestras de sangre de la cola de la rata, se colocaron en portaobjetos perfectamente limpios y se realizaron frotis de sangre. Para la tinción de las muestras, como primer paso, se fijaron con metanol sumergiéndolas por 5 minutos, luego se lavaron con agua corriente y se tiñeron por 18 minutos en tinción de Giemsa al 4% en tampón fosfato pH 6.8, las placas se observado al microscopio de inmersión. Los eritrocitos policromáticos (EPC) se tiñeron de violeta y los eritrocitos normocrómicos (ENC) de azul. Los micronúcleos se observaron de color violeta intenso. Para evaluar la citotoxicidad se determinó la relación entre el número de EPN y ENC. El recuento se hizo en 2000 células por grupo en los tiempos establecidos y se determinó la cantidad de eritrocitos normocrómicos micronucleados para evaluar la genotoxicidad [24,25].

RESULTADOS

Los resultados parciales durante la administración de BZP y después de la

administración de BS fueron los siguientes: El peso de los animales en ambas cepas, presentó una disminución estadísticamente significativa de la tercera a la 7ª semana, sin embargo, el peso comenzó a estabilizarse a partir de la 8ª semana (Figura 2). Las pruebas bioquímicas presentaron diferencias estadísticamente significativas a partir de la 3ª semana de tratamiento con BZP en los valores de la VSG, FA y DHL, en todas las ratas tratadas, sin embargo, a partir de la 8ª semana se observó una disminución de la FA y DHL en algunos animales administrados con BS (Figura 3). El estudio histopatológico demostró la formación de OS en el fémur tratado. El BZP fue altamente genotóxico en ambas cepas de ratas, observándose una diferencia estadísticamente significativa con la prueba de micronúcleos (MN) desde la primera semana de tratamiento con BZP con una frecuencia de hasta 27.36±0.32 MN en 1000 eritrocitos policrómaticos, siendo un poco menos evidente en las ratas W (figura 4).

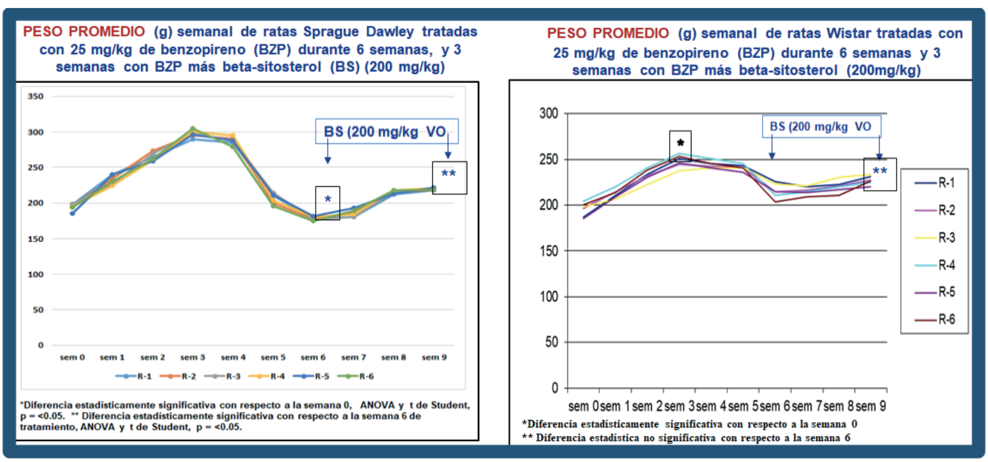


Figura 2. Pesos promedio obtenidos de ratas Sprague Dawley y ratas Wistar tratadas con benzopireno (BZP) y beta-sitosterol (BS)

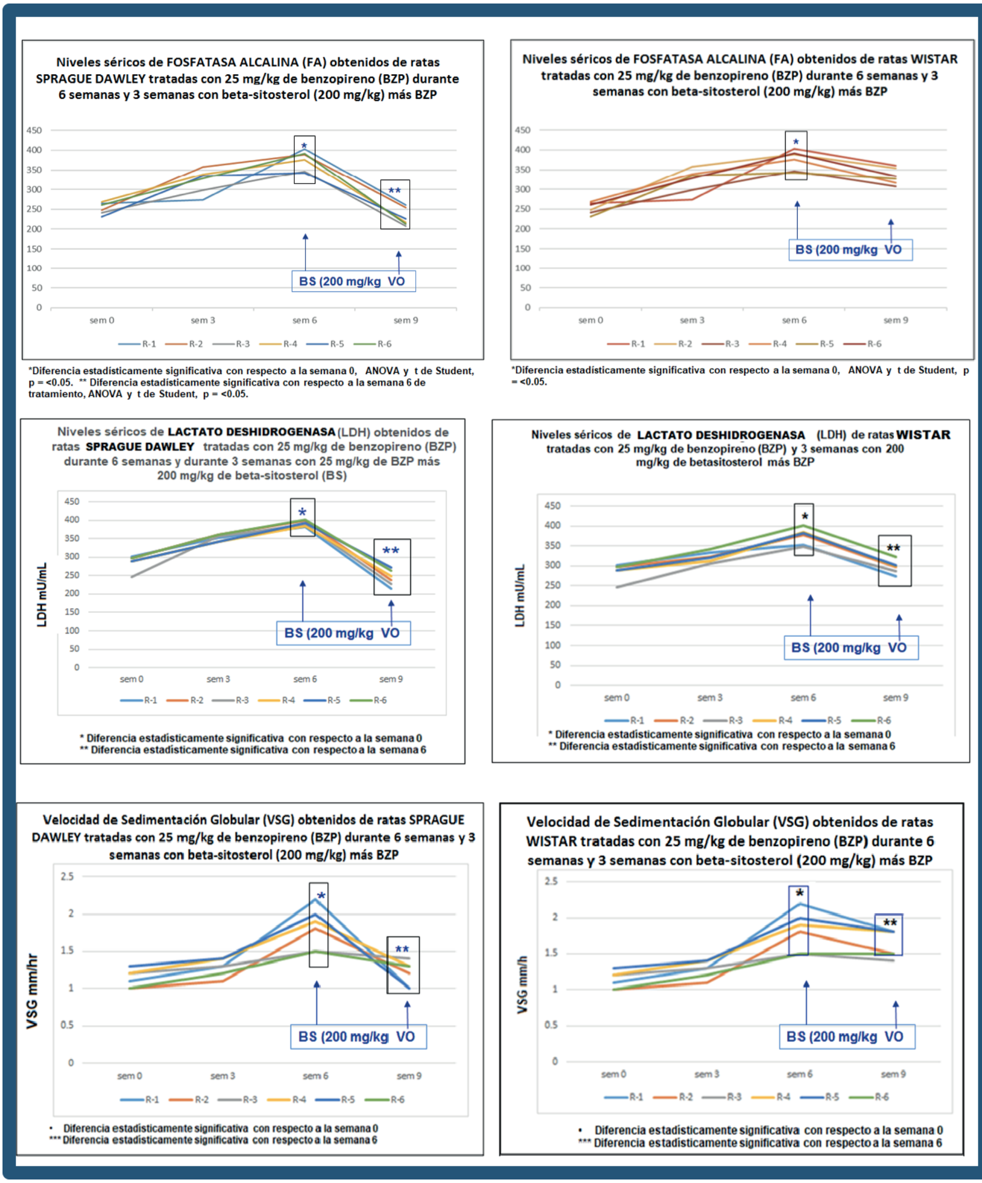


Figura 3. Valores bioquímicos obtenidos de ratas Sprague Dawley y ratas Wistar tratadas con benzopireno (BZP) y beta-sitosterol (BS)

Columna1	R-1 SD	R-1 W	R2-SD	R-2 W	R-3 SD	R-3 W	R-4 SD	R-4 W	R-5 SD	R-5 W	R-6 SD	R-6 W
Sem 0	1.13±0.16	1 ± 0.5	1.5 ± .08	2.1±0.4	2.0±0.23	0.93±0.3	1±0.12	1.3±0.4	1.74±0.21	1.98±0.2	1.14±0.32	1.3±0.6
Sem 1	*18.26±0.26	4.97±0.2	*19.8±0.36	5.63±0.2	*19.3±0.36	*7.10±0.1	*20±0.93	*6.73±0.1	*22±0.62	*6.1±0.23	*19.1±0.38	*8.73±0.71
Sem 2	*19.3±0.29	*8.1±0.14	*26.8±0.17	*7.9±0.14	*17.7±0.52	*9.5±0.08	*23.5±0.44	*7.1±0.14	*18.6±0.19	*11.2±0.13	*17.33±0.61	*9.1±0.35
Sem 3	*26.4±0.31	*7.5±0.08	*25±0.12	*11.5±0.8	*29.76±0.11	*13.1±0.1	*26.93±o.61	*9.5±0.12	*29.5±0.24	*13.3±0.32	*25.38±0.33	*11.3±0.36
Sem 4	*20.5±0.22	*14.5±0.4	*24.4±0.38	*18.2±0.1	*28.16±0.21	*19.4±0.5	*23.83±0.27	*16.3±0.23	*27.5±0.34	*14.14±0.21	*27.36±0.14	*16.6±0.17
Sem 5	*27.4±0.51	*19.1±0.6	*28±0.19	*19.8±0.6	*29.76±0.11	*18±0.24	*31.43±0.41	*15.45±0.35	*28.9±0.29	*16.4±0.45	*30.38±0.30	*17.8±0.31
Sem 6	*30.5±0.41	*18.2±0.7	*29.5±0.28	*18.0±0.26	*30.16±0.34	*18.2±0.43	*33.5±0.58	*20.4±0.71	*32.5±0.13	*19.3±0.22	*31.33±0.32	20.6±0.23
Sem 7	*20.5±05	**11.2±0.7	*22.2±0.3	*15.8±0.11	*20.5±0.42	*16.4±0.52	*29.1±0.31	*16.4±0.33	*23.4±0.45	*17.4±0.62	*26.4±0.12	**13.8±0.6
Sem 8	*21.2±0.1	**10.6±0.6	*17.5±0.34	*16.8±0.34	*18.24±0.22	*15.4±0.67	**14.3±0.22	**12.3±0.11	**17.4±0.35	*14.2±0.91	**14.5±0.32	**10.1±0.6
Sem 9	**12.6±0.43	**10.3±0.5	**13.2±0.11	*15.2±0.23	**11.16±0.21	*14.8±0.45	**12.5±0.11	**13.6±0.36	**14.2±0.11	**13.7±0.11	**12.5±0.56	**8.3±0.5

Figura 4. Frecuencia de micronúcleos en ratas Sprague Dawley (SD) y ratas Wistar (W) tratadas con benzopireno (BZP) 25 mg/kg por 6 semanas y 3 semanas con beta-sitosterol (BS) 200 mg/kg más BZP.

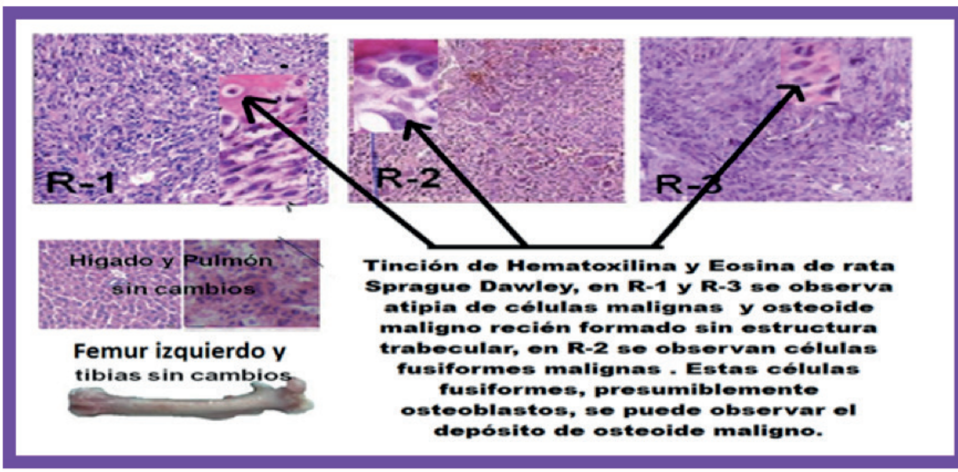


Figura 5. Resultados histológicos de ratas Sprague Dawley tratadas con benzopireno y beta-sitosterol.

DISCUSIÓN

Estudios experimentales en animales sobre benzopireno lo han clasificado como un tóxico que afecta la fertilidad en ratas y otras especies animales, porque los metabolitos resultantes interfieren con la función normal del ovario [26]. Tsai-Turton, et al. [27], en 2007, evaluaron la acumulación de metabolitos de BZP en microsomas hepáticos y testiculares de ratas, hámsters y cerdos, encontrando que varios de estos interfieren con la formación y función de los gametos, contribuyendo así a la infertilidad. En tejidos celulares de hígado y ovario de varias especies (ratas, ratones, cabras, ovejas, cerdos y vacas) se observó que ante la exposición a 5 µg/g de BZP los metabolitos resultantes se adhieren al receptor de estrógenos, reduciendo la actividad de estos; la exposición prolongada a BZP provoca un secuestro de estas en las lipoproteínas de alta densidad que son esenciales para la biosíntesis de hormonas esteroides en el ovario, lo que conduce a

la reducción de la secreción de gonadotropinas, como la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH), con resultados negativos. resulta en las etapas finales del desarrollo folicular, disminuyendo la fertilidad [28,29]. Se ha informado que BZP es un potente inductor de OS, con características similares a la fisiopatología de OS en humanos y la supervivencia es de hasta 8 meses en animales tratados [14]. Dados los efectos cancerígenos y mutagénicos del Benzopireno, proponemos este compuesto como sustancia química para inducir osteosarcoma en ratas Sprague Dawlwy. Wester y colegas [30], demostraron el potencial carcinogénico de la administración oral de BZP, estos investigadores expusieron a 104 ratas Wistar durante cinco días a la semana a cantidades de 0, 3, 10 o 30 mg de BZP por kg de peso corporal, durante dos años y posteriormente se realizaron estudios histopatológicos. Los resultados mostraron el desarrollo de tumores en el hígado en 99 de las 104 ratas, con una dosis estimada de 3-5 mg/kg, con un intervalo de confianza del 90%, de igual forma mostraron sarcomas en tejidos blandos, como la piel. y mamas con una dosis de 10 mg/kg. Tanto los tumores de piel como los de hígado se consideraron relevantes para humanos en dosis altas.

Respecto a beta-sitosterol en una revisión publicada por Ovesna et al [31], grabaron la inhibición experimental de desarrollo de cáncer de colon y de mama por taraxasterol y β-sitosterol. Indicaron que estos compuestos pueden afectar a diferentes niveles de desarrollo del tumor, tales como sus efectos inhibitorios sobre la creación, promoción e inducción de las células cancerosas, así como inhibición de la invasión de las células del tumor y metástasis. Suplemento dietético con BS disminuye los niveles de 17β-estradiol (E2) lo que sugirió que altos niveles de fitosteroles puede tener efecto beneficioso en las mujeres con cáncer de mama [32]

El análisis genotóxico se utiliza para determinar cuánto daño ejerce en el DNA los xenobióticos, que pueden por lo tanto afectar a humanos expuestos a ellas. Paniagua-Pérez [33] reportaron la genotoxicidad del β-sitosterol, incluyendo el ensayo de toxicidad aguda, que demostró potencial letal baja (38%) de este compuesto. Los resultados indicaron que no SCE (hermana intercambios del cromátide) aumento fue inducido por las dosis probadas (200, 400, 600 y 1000 mg/kg), así como no hay cambios en la cinética de proliferación celular, o en el índice mitótico. En dicho informe, la más alta dosis aplicada mostró el 80% de la DL50. Por esta razón, β-sitosterol no se considera como genotóxico y citotóxico. La seguridad de este compuesto estimula los científicos para llevar a cabo más investigaciones farmacológicas de este esterol [33].

Los resultados de un estudio demostraron eso beta-sitosterol en la carcinogénesis de colon inducida por el 1, 2-dimetilhidrazina en elevación de ratas causadas en antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, que recomiendan el compuesto como un medicamento quimiopreventivo efectivo para la carcinogénesis de colon [34]. Beta-sitosterol estimula enzimas antioxidantes por la activación del receptor de estrógeno/PI3-cinasa-dependentpathway. La proporción de glutatión GSH y GSH total se recuperó después del

tratamiento de β-sitosterol, sugiriendo que este fitosterol puede ser una buena alternativa de tratamiento ROS [35].

CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que la administración de BZP contribuye en ratas Sprague Dawley y Wistar a la inducción de OS, datos preliminares sugieren que la administración de BS puede ayudar a disminuir la actividad carcinogénica del BZP, lo que nos da la pauta para continuar con otros estudios que permitan considerar el uso del BS en personas con OS.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Paniagua-Pérez Rogelio, Franco y Bourland Rebecca E, Madrigal-Bujaidar Eduardo, Álvarez-González Isela, diseñaron este tema de investigación y escribieron el manuscrito; Martínez-Canseco Carlos J, Araujo Monsalvo Victor M, Domínguez Hernández Victor M, Martínez Coria Elisa, Diseñaron y ejecutaron parte de la metodología; Cruz Hernández Lidia, Ruiz Rosano Lidia, García Campillo Hiram, Quintana Armenta Alejandra, realizaron los experimentos y recolectaron y analizaron los datos.

AGRADECIMIENTO:

Los autores desean agradecer a por su apoyo a de la Fuente Sánchez Jorge A y Mejenes López Ricardo N, por su apoyo en la ejecución de la etapa experimental en el Bioterio del INRLGII.

CONFLICT OF INTEREST DECLARATION

The authors of this manuscript we have no conflict of interest to declare.

REFERENCES

1. Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA (2009) Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: Data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. Cancer 115: 1531.

2. Harrison DJ, Geller DS, Gill JD, et al. (2018) Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma. Expert Rev Anticancer Ther 18: 39-50.

3. Anderson ME (2016) Update on survival in osteosarcoma. Orthop Clin North Am 47: 283-292.

4. Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA (2009) International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. Int J Cancer 125: 229-234.

5. Morrow JJ, Khanna C (2015) Osteosarcoma genetics and epigenetics: emerging biology and candidate therapies. Crit Rev Oncog 20: 173-197.

6. Anninga JK, Gelderblom H, Fiocco M, et al. (2011) Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: where do we stand? Eur J Cancer 47: 2431.

7. Aljubran AH, Griffin A, Pintilie M, et al. (2009) Osteosarcoma in adolescents and adults: survival analysis with and without lung metastases. Ann Oncol 20: 1136.

8. Ottaviano L, Schaefer KL, Gajewski M, et al. (2010) Molecular characterization of commonly used cell lines for bone tumor research: a trans-European EuroBoNet effort. Genes Chromosomes and Cancer 49: 40-51.

9. Ek ET, Dass CR, Choong PF (2006) Commonly used mouse models of osteosarcoma. Critical Reviews in Oncology/Hematology 60: 1-8.

10. Mohseny AB, Machado I, Cai Y, et al. (2011) Functional characterization of osteosarcoma cell lines provides representative models to study the human disease. Laboratory Investigation 91: 1195-1205.

11. Mestas J, Hughes CC (2004) Of mice and not men: Differences between mouse and human immunology. Journal of immunology 172: 2731-2738.

12. Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, et al. (2011) Surgical approaches to create murine models of human wound healing. J Biomed Biotechnol 2011: 969618.

13. Volk SW, Bohling MW (2013) Comparative wound healing--are the small animal veterinarian's clinical patients an improved translational model for human wound healing research? Wound Repair Regen 21: 372-381.

14. Brunschwing, AD Bissell (1938) Production of osteosarcoma in a mouse by the intramedullary injection of 1,2-benzpyrene. Archives of Surgery 36.

15. Akeda K, Nishimura A, Satonaka H, et al. (2009) Three-dimensional alginate spheroid culture system of murine osteosarcoma. Oncology Reports 22: 997-1003.

16. Baker JR (1946) Cytological Technique. Methuen, London.

17. Liu Z, Wang J, Yin P, et al. (2009) RGD-fasl induces apoptosis in hepatocellular carcinoma. Cell Mol Immunol 6: 285-293.

18. Zurera LJ, Canis M, Marchal T, (2008) Histological study of the effect of pre-transplant chemoembolization of hepatocellular carcinoma. Radiología 50: 47-53.

19. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2010) Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 92: 1-853.

20. Salehi F, Turner MC, Phillips KP, et al. (2008) Review of the etiology of breast cancer with special attention to organochlorines as potential endocrine disruptors. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 11: 276-300.

21. Lawal AT (2017) Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. Cogent Environmental Science 3.

22. Ahrendt SA, Decker PA, Alawi EA, et al. (2001) Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. Cancer 92: 1525- 1530.

23. Barnes DW, Carr TE, Evans EP, et al. (1970) 90Sr-induced osteosarcomas in radiation chimaeras. Int J Radiat Biol 18: 531- 537.

24. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, et al. (1991) Micronuclei as an Index of Cytogenetic Damage: Past, Present, and Future. Environm Molec Mut 18: 277-290.

25. Paniagua-Pérez R, Madrigal-Bujaidar E, Reyes-Cadena S, et al. (2008) Cell protection induced by beta-sitosterol: inhibition of genotoxic damage, stimulation of lymphocyte production, and determination of its antioxidant capacity. Arch Toxicol 103: 569- 573.

26. (2008) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food [1] - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. EFSA J 724: 2-114.

27. Tsai-Turton M, Nakamura BN, Luderer U (2007) Induction of apoptosis by 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene in cultured preovulatory rat follicles is preceded by a rise in reactive oxygen species and is prevented by glutathione. Biol Reprod 77: 442- 451.

28. Smith TL, Merry ST, Harris DL, et al. (2007) Species-specific testicular and hepatic microsomal metabolism of benzo(a) pyrene, an ubiquitous toxicant and endocrine disruptor. Toxicol In Vitro 21: 753-758.

29. Harris DL, Huderson AC, Niaz MS, et al. (2009) Comparative metabolism of benzo(a)pyrene by ovarian microsomes of various species. Environ Toxicol 24: 603-609.

30. Wester PW, Muller JJ, Slob W, et al. (2012) Carcinogenic activity of benzo[a]pyrene in a 2 year oral study in Wistar rats. Food Chem Toxicol 50: 927-935.

31. Ovesna Z, Vachalkova A, Horvathova K. Taraxasterol and beta-sitosterol: new naturally compounds with chemoprotective/chemopreventive effects. Neoplasma. 2004;51:407-14.

32. Ju YH, Clausen LM, Allred KF, Almada AL, Helferich WG. β-sitosterol, β-sitosterol glucoside, and a mixture of β-sitosterol and β-sitosterol glucoside modulate the growth of estrogen-responsive breast cancer cells *In vitro* and in ovariectomized athymic mice. J Nutr. 2004;134:1145-51.

33. Paniagua-Perez R, Madrigal-Bujaidar E, Reyes-Cadena S, Molina-Jasso D, Gallaga JP, Silva-Miranda A, et al. Genotoxic and cytotoxic studies of beta-sitosterol and pteropodine in mouse. J Biomed Biotechnol. 2005;2005:242-7.

34. Baskar AA, Al Numair KS, Paulraj MG, Alsaif MA, Al Muamar M, Ignacimuthu S. *β*-Sitosterol prevents lipid peroxidation and improves antioxidant status and histoarchitecture in rats with 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer. J Med Food. 2012;15:335-43.

35. Vivancos M, Moreno JJ. β-Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. Free Radical Biol Med. 2005;39:91-7.

36. Compagnone D, Curini R, D'Ascenzo G, et al. (2011) Neutral loss and precursor ion scan tandem mass spectrometry for study of activated benzopyrene-DNA adducts. Anal Bioanal Chem 401: 1983-1991.

37. Culp SJ, Gaylor DW, Sheldon WG, et al. (1998) A comparison of the tumors induced by coal tar and benzo[a]pyrene in a 2-year bioassay. Carcinogenesis 19: 117-124. 37. Ozaki T, Nakagawara A (2010) p53: the attractive tumor suppressor in the cancer research field. J Biomed Biotechnol 2011.

CAPÍTULO 4

ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA DE *MIMOSA LACERATA* EN CÉLULAS HEPG2

Data de aceite: 04/07/2023

Vianey Moreno-Dimas
Universidad Autónoma de Guerrero, Facultad de Ciencias Químico Biológicas.

Dolores Vargas Álvarez
Universidad Autónoma de Guerrero, Facultad de Ciencias Químico Biológicas.

Guillermina Vences-Velázquez
Universidad Autónoma de Guerrero, Facultad de Ciencias Químico Biológicas.

Luz del Carmen Alarcón-Romero
Universidad Autónoma de Guerrero, Facultad de Ciencias Químico Biológicas.

RESUMEN: Introducción: El hígado es uno de los órganos más importantes que participa en la desintoxicación, por lo que a menudo se encuentra sujeto a estrés oxidativo lo que conlleva a un daño celular grave. Por esta razón las plantas medicinales, debido a su riqueza natural en compuestos, han sido utilizadas para obtener compuestos bioactivos que podrían aplicarse en el tratamiento de dolencias hepáticas. *Mimosa lacerata* es utilizada en la medicina tradicional, sin embargo, las propiedades hepatoprotectoras de esta planta no han sido investigadas. **Objetivo:** Evaluar *in vitro* la actividad antioxidante de las fracciones de *Mimosa lacerata* en el papel hepatoprotector ante la inducción de daño hepático con CCl_4. **Material y métodos**: Se realizó un perfil fitoquímico por cromatografía en capa fina y resonancia magnética nuclear (RMN) de los extractos y fracciones previamente obtenidas de *Mimosa lacerata*. La actividad antioxidante se midió mediante el ensayo de eliminación de radicales libres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). El efecto biológico de los extractos se evaluó mediante la determinación de los niveles de aspartato amino transferasa en células HepG2 tratadas con CCl_4. **Resultados**: La elucidación estructural de RMN del extracto metanólico sugiere la presencia de taninos, principalmente de polímeros de profisetidina/ prorobinetidina. Se encontró una alta actividad antioxidante para el extracto metanólico (CE50 4.58 $\mu g\ mL^{-1}$) y la fracción 2 (5.59 ± $\mu g\ mL^{-1}$). El tratamiento previo de células HepG2 con estos extractos mostró protección contra el daño hepático inducido por CCl_4 al reducir significativamente la actividad enzimática de AST ($p < 0.05$). **Conclusiones**: El extracto metanólico y la fracción 2 de *M. lacerata* poseen actividad biológica en

células HepG2 tratadas con CCl_4, al reducir significativamente los niveles de AST, efecto que se atribuye a sus propiedades antioxidantes.
PALABRAS CLAVE: Antioxidante, hepatoprotector, estrés oxidativo, extractos naturales, *Mimosa lacerata.*

ABSTRACT: Introduction: The liver is one of the most important organs that participates in detoxification, so it is often subject to oxidative stress, which leads to serious cell damage. For this reason medicinal plants, due to their natural richness in compounds, have been used to obtain bioactive compounds that could be applied in the treatment of liver ailments. *Mimosa lacerata* is used in traditional medicine, however, the hepatoprotective properties of this plant have not been investigated. **Objective**: To evaluate *in vitro* the antioxidant activity of the *Mimosa lacerata* fractions in the hepatoprotective role before the induction of liver damage with CCl_4. **Material and methods**: A phytochemical profile was made by thin layer chromatography and nuclear magnetic resonance (NMR) of the extracts and fractions previously obtained from *Mimosa lacerata*. The antioxidant activity was measured by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay. The biological effect of the extracts was evaluated by determining the levels of aspartate amino transferase in HepG2 cells treated with CCl_4 **Results.** The structural elucidation of NMR of the methanolic extract suggests the presence of tannins, mainly of polymers of profisetidine/proobinethidine. A high antioxidant activity was found for the methanolic extract (EC50 4.58 μg mL-1) and fraction 2 (5.59 ± μg mL-1). Pretreatment of HepG2 cells with these extracts showed protection against CCl_4-induced liver damage by significantly reducing the enzymatic activity of AST ($p < 0.05$). **Conclusions**: The methanolic extract and fraction 2 of *M. lacerata* have biological activity in HepG2 cells treated with CCl_4, by significantly reducing AST levels, an effect that is attributed to their antioxidant properties.
KEYWORDS: antioxidant, hepatoprotective, oxidative stress, natural extracts, *Mimosa lacerata.*

MARCO TEÓRICO

1 I ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL HÍGADO

El hígado es la glándula más voluminosa del cuerpo y pesa alrededor de 1,4 kg en el adulto promedio. Se encuentra por debajo del diafragma y ocupa la mayor parte del hipocondrio derecho y parte del epigastrio, en la cavidad abdominopelviana, rodeado casi por completo por el peritoneo visceral y revestido en su totalidad por una capa de tejido conectivo denso irregular, que yace en la profundidad del peritoneo (Tortora y Derrickson, 2010). Se divide en cuatro lóbulos: lóbulo derecho (lóbulo más grande), lóbulo izquierdo, lóbulo cuadrado (ubicado entre la vesícula biliar y el ligamento redondo del hígado), y lóbulo caudado (ubicado entre la vena cava inferior, el ligamento venoso y el porta hepático) (Hansen *et al*., 2015).

Desde el punto de vista histológico, se encuentra formado por hepatocitos, que

son las principales células funcionales del hígado con una amplia variedad de funciones metabólicas, secretoras y endocrinas; otros componentes son los canalículos biliares (pequeños conductos que recogen la bilis producida por los hepatocitos) y sinusoides hepáticos (Tortora y Derrickson, 2010), los cuales están revestidos por células endoteliales, con la característica de ser más permeables que otros capilares (Fox, 2013), y tienen la función de recibir sangre oxigenada de las ramas de la arteria hepática y sangre desoxigenada de las ramas de vena porta (Marshall *et al*., 2013). Dentro de los sinusoides hepáticos se encuentran las células fagocíticas de Kupffer, que son integrantes del sistema reticuloendotelial (también llamado sistema fagocítico mononuclear) (Fox, 2013).

El hígado realiza importantes funciones como el almacenamiento de hierro y vitaminas (vitaminas B12 y vitamina A), producción de ácidos biliares, excreción de sustancias (bilirrubina) (Hansen *et al*., 2015), metabolismo y excreción de hormonas esteroideas (Marshall *et al*., 2013). Además, cumple funciones vitales en el metabolismo de los hidratos de carbono en los procesos de glucogénesis, lipogénesis, glucogenólisis y gluconeogénesis. Otra función hepática es el metabolismo de los lípidos en la síntesis de triglicéridos y colesterol, excreción de colesterol y la generación de ATP a partir de ácidos grasos. El hígado participa también en el metabolismo de las proteínas en la producción de albúmina, y de factores de la coagulación (fibrinógeno, protrombina y otros). Además, juega un papel importante en el procesamiento de fármacos capaz de detoxificar sustancias, como el alcohol, y excretar fármacos (Fox, 2013).

2 I METABOLISMO DE FÁRMACOS

El citocromo P450 se trata de una familia hemoproteínas, involucradas en el metabolismo de fármacos a través de reacciones enzimáticas, que desempeña un papel clave en la desintoxicación y la toxificación (Testa y Clement, 2015), a través de reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, entre otras, para generar compuestos que puedan ser excretados con mayor facilidad (Olsen *et al*., 2015). Este sistema enzimático está presente en mamíferos, siendo el hígado el tejido más importante donde el citocromo P450 es extremadamente activo, localizado en la membrana del retículo endoplasmático liso y en la membrana interna mitocondrial, donde desempeñan funciones biosintéticas de compuestos endógenos y de biotransformación de xenobióticos (Rodríguez y Rodeiro, 2014).

Las reacciones de biotransformación de xenobióticos se han agrupado en dos fases, fase I y II. En la fase I los xenobióticos son transformados mediante reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, y convertidos en productos más hidrosolubles a causa de la formación de nuevos grupos funcionales polares (carboxilo, hidroxilo, amino) (Rodríguez y Rodeiro, 2014). En la fase II, los fármacos o metabolitos de las vías de la fase I se conjugan enzimáticamente con un compuesto endógeno hidrófilo con la ayuda de enzimas transferasas, con moléculas endógenas de carácter polar (ácido glucurónico, sulfatos,

acetatos, glutatión o algunos aminoácidos) para combinarlos mediante reacciones de glucuronoconjugación, sulfonación y acetilación. El objetivo final de esta fase es aumentar la solubilidad en agua de los compuestos y facilitar su excreción a través de la orina o la bilis (Almazroo *et al*., 2017). Sin embargo, se ha encontrado que estas reacciones así como determinados conjugados de glutatión reducido (GSH) desempeñan un papel importante en la toxificación, debido a la generación de metabolitos tóxicos o reactivos capaces de inducir toxicidad, y con un impacto considerable para generar de una lesión hepática (Testa *et al*., 2012).

3 I HEPATOTOXICIDAD Y LESIÓN HEPÁTICA INDUCIDA POR FÁRMACOS

El hígado es altamente susceptible a efectos adversos de los xenobióticos a causa de su particular vulnerabilidad, debido a su papel activo en el metabolismo y excreción de los medicamentos (Hañari-Quispe *et al*., 2015). La hepatotoxicidad resulta de la toxicidad directa de los compuestos primarios, sus metabolitos reactivos o de la respuesta inmune que afecta a los hepatocitos, células epiteliales biliares, y/o vasculatura hepática (Tolosa *et al*., 2018) y es el resultado de la toxicidad directa del fármaco, relacionada con la dosis (Dara *et al*., 2016).

Los hepatocitos están constituidos por abundantes mitocondrias, reconocidas como mediadoras críticas en la hepatotoxicidad inducida por fármacos, proceso en el cual una gran cantidad de funciones mitocondriales se ven afectadas (Ramachandran *et al*., 2018). La toxicidad se puede estimar como reducciones en la viabilidad celular, también como alteraciones en varios parámetros indicativos de daño celular mediante diferentes mecanismos como disfunción mitocondrial, estrés oxidativo o acumulación de lípidos (Tolosa *et al*., 2019).

Según la duración de la lesión y la ubicación histológica del daño, se clasifica como aguda o crónica, y ya sea como hepatitis, colestásica o como un patrón mixto de lesión (David y Hamilton, 2010).

El diagnóstico de lesión hepática se basa en gran medida con el historial de un fármaco conocido de causar esta patología, así como la exclusión de otras posibles causas de lesión hepática (Navarro *et al*., 2017). Sin embargo, se asocia con un aumento en los niveles de enzimas hepáticas y bilirrubina. El patrón de estas anomalías puede ser hepatocelular, colestásico o mixto. El patrón hepatocelular se caracteriza por niveles elevados de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), que refleja la destrucción de los hepatocitos (David y Hamilton, 2010). En cuanto a la histología hepática es bastante común mostrar una colestasis blanda y canalicular con escasa necrosis e inflamación de hepatocitos (Hu *et al*., 2016).

3.1 Hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono (CCl_4)

El tetracloruro de carbono (CCl_4) es una hepatotóxica común que se usa ampliamente para inducir lesiones hepáticas asociadas a estrés oxidativo *in vivo* o *in vitro*, así como para evaluar las propiedades protectoras de los ingredientes activos de plantas (Ma *et al*., 2014).

Se trata de un hidrocarburo clorado, incoloro, volátil y muy estable, utilizado como refrigerante, agente de limpieza en seco y como disolvente para aceites y grasas. La inhalación de sus vapores puede deprimir la actividad del sistema nervioso central y causar la degeneración del hígado y los riñones. Así mismo, es un carcinógeno humano basado en la evidencia de carcinogenicidad en animales de experimentación (NCI Thesaurus, 2019).

El CCl_4 produce una intoxicación aguda en humanos, por ingestión o inhalación. Datos experimentales mencionan que sólo alrededor del 1% del CCl_4 incorporado es responsable de producir una la lesión hepática, debido a que es metabolizado en el hígado por el citocromo P450 2E1, en donde se producen radicales tóxicos (Teschke, 2018). Los radicales triclorometilo (CCl_3*), derivados del metabolismo del CCl_4, pueden iniciar el estrés oxidativo que resulta en hepatotoxicidad, asimismo, estos radicales se pueden biotransformar en triclorometil peroxi (CCl_3OO*), un oxidante fuerte (Tseng *et al*., 2018), que atacan las estructuras celulares, incluidas las proteínas y fosfolípidos, lo que conduce a la apoptosis y necrosis celular (Teschke, 2018), este proceso de ilustra en la figura 1.

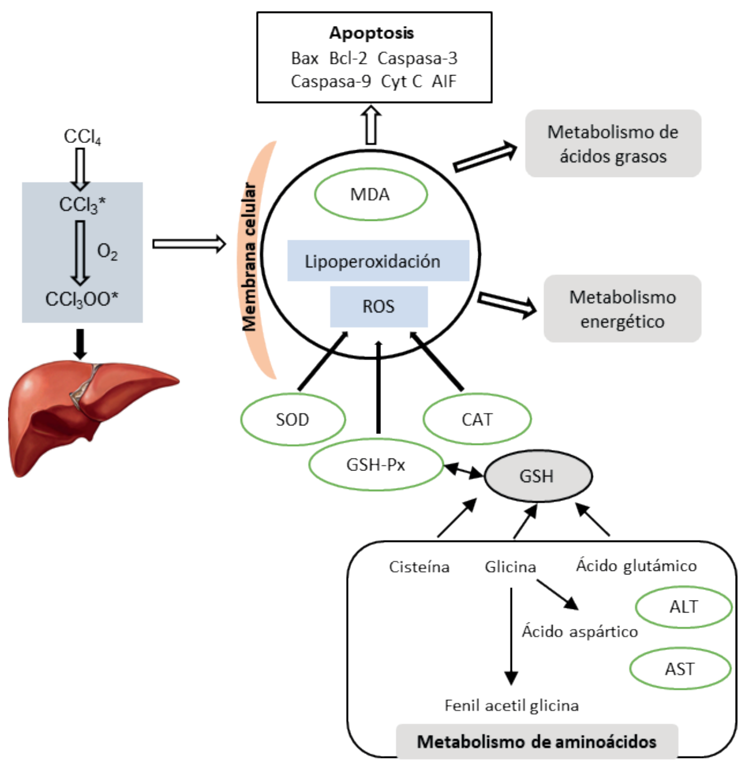


Figura 1. Hepatotoxicidad causada por CCl_4. Modificado de Zhu *et al*., 2019.

En los últimos años, investigadores como Jia, *et al.,* 2014 y Zeng *et al*., 2017 han evaluado el daño hepático causado por CCl_4 en distintos modelos experimentales, a través de marcadores apoptóticos, inflamatorios y parámetros de estrés oxidativos, así como la evaluación de biomarcadores séricos. Cómo se observa en la tabla 1, diferentes estudios coinciden en la observación de un incremento de los niveles de caspasa-3, caspasa-9, Bax, factor de necrosis alfa (TNF-α), interleucina-6 (IL-6), factor nuclear κB (NF-κB), malondialdehido (MDA), AST, ALT y fosfatasa alcalina (ALP), así como una disminución en los niveles de expresión de las proteínas Bcl-2, glutatión (GSH) , superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px).

Modelo experimental	Marcadores apoptóticos	Marcadores de inflamación	Parámetros de estrés oxidativo	Perfil bioquímico	Referencia
Ratas	--------	--------	Disminución de GSH, SOD y CAT Aumento de MDA	Aumento de AST, ALT y ALP	(Zeashan *et al*., 2008)
Carpa común	Aumento de caspasa-3, caspasa-8 y caspasa-9	Aumento de TLR4	Disminución de SOD, GSH-Px, CAT y GSH Aumento de MDA	Aumento de ALT y AST	(Jia *et al*., 2014)
Ratas	----------	---------	Disminución de CAT, SOD, GSH y GSH-Px Aumento de MDA	Aumento de ALT, AST, ALP y bilirrubina	(Oriakhi *et al*., 2018)
Ratas	Aumento de caspasa-9, Bax, Cyt C, caspasa-3 Disminución de Bcl-2	--------	Disminución en los niveles de SOD, CAT y GSH-Px Aumento de MDA	Aumento de ALT y AST	(Zhu *et al*., 2019)
Ratas	----------	Aumento de, TNF-α, IL-6 y NFkB	Disminución de GSH Aumento de MDA y NO	Aumento de ALT Y AST	(Fathy *et al*., 2019)
Ratones	Aumento de Caspasa-3 y Bax Disminución de Bcl-2	Incremento de TNF-α, IL1β, IL-6 y NFkB	Disminución de los niveles de SOD, CAT y GSH-Px y GSH Aumento de MDA	Aumento de ALT Y AST	(Zeng *et al*., 2017)

Bcl-2 asociado a proteína X (Bax), factor de necrosis alfa (TNF-α), glutatión (GSH), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-Px), malondialdehido (MDA), aspartato amino transferasa (AST), alanino amino transferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP), receptor 4 tipo Toll (TLR4), factor nuclear κB (NF-κB), interleucina 6 (IL-6), linfoma de células B2 (Bcl-2), citocromo C (Cyt C) y óxido nítrico (NO).

Tabla1. Efecto del CCl_4 en diferentes modelos experimentales.

4 I PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

El estrés oxidativo es un estado en el cual las defensas y antioxidantes celulares son insuficientes para inactivar completamente las sustancias oxidantes generadas, debido a una producción excesiva de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y especies reactivas de nitrógeno (RNS por sus siglas en inglés), lo que ocasiona daño a las proteínas, ácidos nucleicos, los lípidos insaturados, comprometiendo la salud y viabilidad celular, originando una gran variedad de respuestas celulares que puede conducir a la muerte celular por necrosis o apoptosis (Souki *et al.*, 2015). Se cree que contribuye al desarrollo de varias enfermedades, incluido el cáncer (Alexandre *et al.*, 2017).

Existen múltiples fuentes celulares de generación de ROS, pero las más significativas son los complejos mitocondriales de transporte de electrones I y III, las enzimas P450 dentro del retículo endoplásmico. Sin embargo, estos intermedios reactivos interactúan con otras moléculas para formar ROS secundarias, como productos de peroxidación de lípidos, peroxinitrito y ácido sulfénico y disulfuros, estos procesos se ilustran en la figura 2 (Singal *et al.*, 2011). Además, otras circunstancias que pueden producir daño oxidativo grave se encuentran las infecciones, los procesos inflamatorios, determinadas anomalías metabólicas, el consumo excesivo de ciertos fármacos, la exposición a una radiación intensa, o el contacto frecuente con determinados contaminantes ambientales (McKee y McKee, 2013).

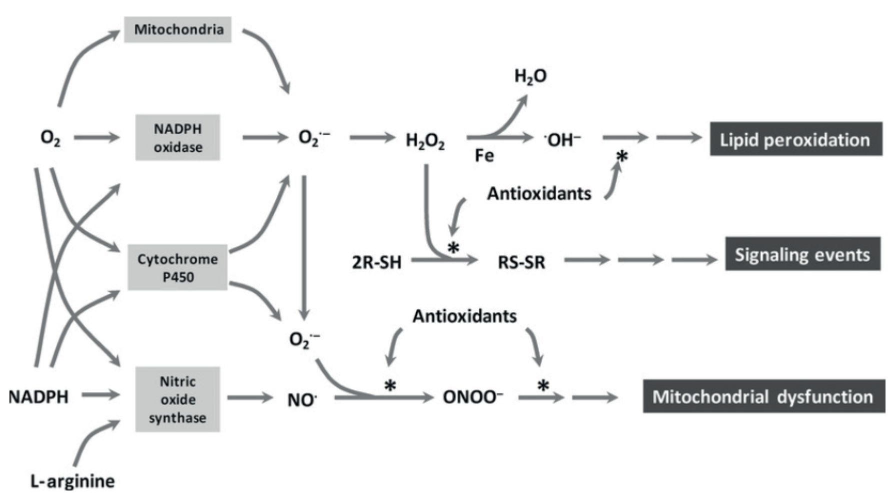


Figura 2. Efecto reactivo de las especies de oxígeno y nitrógeno. A la izquierda, la figura, representa esquemáticamente las principales fuentes de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de especies reactivas de nitrógeno (RNS) en el hígado. Los productos inmediatos de estas fuentes, el superóxido y el óxido nítrico, se someten a una serie de reducciones e interacciones posteriores que conducen a la peroxidación de lípidos, la formación de disulfuros que desencadenan varios eventos singulares y la reducción de la respiración mitocondrial con un aumento adicional en la producción de ROS mitocondrial. Los compuestos antioxidantes, pueden actuar como eliminadores de radicales libres que inhiben la progresión de estas vías (Singal *et al.*, 2011).

Los antioxidantes son aquellas moléculas que participan en la eliminación de estas especies reactivas, que causan estrés oxidativo, y actúan como eliminadores de radicales libres y pueden prevenir reacciones oxidativas, que conducen a diversas enfermedades. Los antioxidantes endógenos producidos por el organismo incluyen enzimas antioxidantes tales como catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reducido (GSH) (Sarangarajan *et al*., 2017). Estas enzimas antioxidantes son proteínas involucradas en la transformación catalítica de especies reactivas de oxígeno y sus subproductos en moléculas no tóxicas (Schwab, 2017).

Los antioxidantes exógenos ingeridos por la dieta abarcan diferentes clases de compuestos que pueden interferir con ciclos oxidativos para inhibir o retardar el daño oxidativo de las biomoléculas. Dentro de estos, las principales clases de componentes con actividad antioxidante son: vitaminas (vitamina C y vitamina E), carotenoides (carotenos y xantofilas) y polifenoles (flavonoides, ácidos polifenólicos, lignanos y estilbenos) (Oroian y Escriche, 2015).

5 I ETNOBOTÁNICA Y EL POTENCIAL HEPATOPROTECTOR

La etnobotánica se denomina como la disciplina científica de la interacción del hombre con las plantas, la cual incluye el estudio de la dinámica de los ecosistemas e involucra componentes naturales y sociales (Carreño-Hidalgo, 2016). El conocimiento tradicional que se conoce, es el resultado de innumerables observaciones y experimentos empíricos de generaciones que observaron a la naturaleza, registraban y transmitían sus conocimientos a nuevas generaciones, a través de sus estelas, códices o a través de las enseñanzas verbales (Gómez-Pompa, 1993).

Las plantas medicinales, especialmente aquellas con uso tradicional, siempre han sido consideradas como una fuente rica de nuevos medicamentos efectivos (Shehab *et al*., 2015), es un hecho que una cuarta parte de todas las recetas médicas son formulaciones basadas en sustancias derivadas de plantas o análogos sintéticos derivados de plantas (Gurib-Fakim, 2006).

El consumo de plantas medicinales y tradicionales en la protección del hígado de efectos nocivos de las hepatotóxinas, que el hombre ingiere para contrarrestar alteraciones en los mecanismos de defensa antirradicalarios, son agentes llamados hepatoprotectores (Selema y Martínez, 1999). Los hepatoprotectores ocupan un lugar clave en el tratamiento de prácticamente todas las demás enfermedades hepáticas, pues ayudan a restaurar sus funciones y a normalizar o mejorar la actividad enzimática de las células hepáticas debido a sus propiedades antioxidantes (Karamalakova *et al*., 2019).

Los antioxidantes derivados de plantas, desde el punto de vista fitoquímico pueden ser taninos, lignanos, estilbenos, cumarinas, quinonas, xantonas, ácidos fenólicos, flavonoides, flavonolones, catequinas, antocianinas y proantocianinas, las cuales debido

a sus propiedades químicas redox pueden actuar como donadores de hidrógeno y de esta manera prevenir o retrasar el desarrollo de enfermedades degenerativas (Robards *et al.*, 1999).

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios de las plantas más numerosos y distribuidos de forma ubicua, estando presentes en las hojas, semillas, corteza y flores de las plantas (Pereira *et al.*, 2016), y van desde compuestos de anillos aromáticos simples y de bajo peso molecular simple, hasta los taninos complejos grandes y polifenoles derivados (Oroian y Escriche, 2015). Lo compuestos fenólicos simples son los ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides, y los compuestos altamente polimerizados incluyen ligninas, lignanos, melaninas, taninos (Pereira *et al.,* 2016). Sus propiedades antioxidantes justifican muchos de sus efectos beneficiosos que les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción (Valencia-Avilés *et al.*, 2017).

Los taninos de acuerdo a su estructura, pueden dividirse ampliamente en dos clases, denominadas taninos hidrolizables y taninos condensados (Oroian y Escriche, 2015). Los taninos hidrolizables se han caracterizado por tener una propiedad antioxidante (Figueroa, *et al.*, 2015).

Desde 1999 se conocía que los flavonoides ocupaban un lugar sobresaliente por sus reconocidas propiedades antioxidantes y su uso como hepatoprotectores (Selema y Martínez, 1999), pues se cree que estos son buenos secuestradores de radicales libres (Sindhi *et al.*, 2013). Estos flavonoides constituyen un grupo extenso de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos y comunes en todo el reino vegetal que se pueden presentar tanto libres como conjugados con azúcares (Selema y Martínez, 1999).

Para el 2014 Torres-González y colaborares, reportaron que en México existía un número reducido de plantas evaluadas para la actividad hepatoprotectora, en modelos celulares y animales, con el objetivo de estudiar diversos extractos de plantas en el desarrollo de nuevos fitofármacos.

Actualmente existen en el mercado medicamentos con actividad hepatoprotectora registrados como Simarin plus®, compuesto por Silimarina. La silimarina es el extracto obtenido de *Silybum marianum*, o cardo mariano, y consta de siete flavonoglignanos (silibinina, isosilibinina, siliquistina, isosilistristina y silidianina) y un flavonoide (taxifolina). Entre estas sustancias, la silibinina prevalece principalmente y tiene el efecto biológico más importante. Su acción se manifiesta en la modulación de la inflamación y la apoptosis, pues se ha demostrado que la silimarina tiene un efecto que permite su uso en todas las causas más frecuentes de daño hepático (Federico *et al.*, 2017).

Estudios en animales, ha demostrado que el pretratamiento con silimarina aumenta significativamente su estado antioxidante con aumentos significativos en las actividades de CAT y GSH hepático (Oriakhi *et al.*, 2018), este último a través de sus efectos directos sobre el metabolismo de los aminoácidos de azufre en el hígado, consistente con la reducción de

la peroxidación lipídica en el hígado (kwon, 2013), así como la inhibición en la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF-a), interferón gamma, como consecuencia del bloqueo de la activación del factor nuclear hepático kappa B (NF-B) (Li, 2012), además de brinda una protección en niveles de AST, ALT, y ALP, con reducción del efecto tóxico del daño hepático (Oriakhi *et al.*, 2018).

6 I GÉNERO *MIMOSA*

El género *Mimosa* pertenece a la familia Fabacea, subfamilia Mimosoideae, y se ubica en la tribu Mimoseae. Por el número de especies, *Mimosa* es el género más importante de las Mimosoideae en México. Presentan diversas formas biológicas, entre las que predominan, arbustos erectos y árboles. Son utilizadas como combustible (leña o carbón), comestible, forraje para ganado caprino y ovino, material para construcción, medicinal, melífera, ornamental, peletería y como implemento agrícola (Camargo, 2001).

Como resultado de la revisión taxonómica del género, en Guerrero se registran 44 especies con 23 variedades y dos subespecies de Mimosa, colocando al Estado en el segundo lugar en diversidad de especies, después de Oaxaca (López, 2018).

6.2 *Mimosa lacerata*

Comúnmente conocida como íacalhuixtle, mezquite, tecolhuistle, uña de gato (Camargo *et al.*, 2001), sierrecilla, garabato (Mendoza-Sabino, 2016), facalhuixtle, hizache, huizpantle y mezquite uña de gato (López, 2018).

Usualmente es un arbusto erecto de dos a cuatro metros de alto, ramificado, de tallos lisos y ásperos con espinas grises o blanquecinas. Las hojas son pequeñas y divididas en hojas más pequeñas que dan la apariencia de plumas. Los frutos son vainas de color rojo-vino o café obscuro, que pueden estar solas o agrupadas, poco alargadas de 3 a 6 cm, aplanadas con las puntas redondeadas. El exterior de los frutos estas parecen tener picos en forma de sierras, con semillas en forma de riñón de color ladrillo como se observa en la figura 3 (Mendoza-Sabino, 2016).

Su hábitat se encuentra en lugares húmedos, bosque mixto o de pino. En México se encuentra ubicada en el estado de Oaxaca, Puebla, Chiapas, Veracruz, Michoacán (Mendoza-Sabino, 2016), Hidalgo, Jalisco, Morelos, Querétaro, Tlaxcala y parte de los estados de Guerrero. Crece en suelos pedregosos, someros, derivado de rocas calizas, que florece y fructifica de febrero a diciembre con producción de frutos inmediatamente después de la floración, considerada una especie endémica en México (López, 2018).

En el 2001 *M. lacerata* se enlista dentro de una de las especies más útiles del género *Mimosa* en México, utilizada como fuente de combustible, forraje y planta medicinal en padecimientos como traumatismos de la piel, erupciones en la boca y fuegos (Camargo

et al., 2001). Así mismo, para el 2016 se reporta el uso de la corteza de esta planta como tratamiento en infecciones gastrointestinales y dolores estomacales, así como una actividad antimicrobiana para *Shigella dysenteriae* (Mendoza-Sabino, 2016), *Avibacterium paragallinarum* y *Pasteurella multocida* como agentes causales en infecciones respiratorias en pollos (Mayo *et al*, 2018).

Taxonomía:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: *Mimosa*

Especie: *lacerata*

Nombre científico: *M. lacerata*

Categoría: plantas ornamentales



Figura 3. *Mimosa lacerata*. A la derecha se observan frutos secos, y a la izquierda se observa un arbusto erecto de dos a cuatro metros de alto, muy ramificados de tallos lisos y ásperos (Mendoza-Sabino.,2016).

6.1.1 Fitoquímica

Mendoza-Sabino en el 2016, realiza el primer estudio fitoquímico de *Mimosa lacerata,* en donde se encontró la presencia de flavonoides, triterpenos y taninos. Así mismo, destaca la presencia de una actividad antioxidante aproximadamente del 78%, capaz de neutralizar radicales libres, además de una alta actividad antibacteriana como

extracto crudo a diferentes concentraciones.

Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* la actividad antioxidante de las fracciones de *Mimosa lacerata* en el papel hepatoprotector ante la inducción de daño hepático con CCl_4

MATERIAL Y MÉTODOS

Recolección de muestras

Los ejemplares de la planta, fueron facilitados por el laboratorio de Producción Integral de Alimentos de la Facultad Académica de Ciencias Químico Biológicas, de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Obtención de los extractos

Se pesaron 30 g de muestra macerada de *M. lacerata*, para su posterior extracción sólido-líquido (maceración secuencial) con el equipo Soxhlet (Anexo 1), utilizando como disolventes: metanol (MeOH) y acetato de etilo:hexano (AcOEt:Hexano) (50:50). Posteriormente, se retiró el disolvente en un rotavapor a 80 rpm a una temperatura de 35°C para la obtención de los extractos (Anexo 2), que fueron depositados en recipientes de cristal para secarlos a temperatura ambiente.

Hidrólisis ácida

Para la obtención de flavonoides libres se realizó la prueba de hidrólisis ácida según la metodología descrita por Vargas y colaboradores en el 2006 (Anexo 3). A 3 g de extracto metanólico, se adicionó 300 mL de HCl 1.2 M en metanol acuoso al 50% durante 2 h a 98 °C en reflujo.

Cromatografía en columna (CC)

La metodología a seguir se realizó de acuerdo a una modificación de lo descrito por Revathy, *et al*, 2011. Para la muestra hidrolizada y extracto metanólico se montó una columna de 46 x 2 empacada con 8 g de gel de sílice y 1 g muestra. Se eluyó de acuerdo a una polaridad creciente: a) metanol, b) AcOEt:hexano (50:50). A todas las fracciones recogidas se eliminó el solvente orgánico mediante un evaporador rotatorio. El contenido total recogido se analizó por cromatografía en capa fina.

Cromatografía en capa fina (CCF)

Las muestras obtenidas del rotavapor se analizaron por cromatografía en capa fina

(CCF) (Anexo 4) en la fase estacionaria de gel de sílice 60. Los sistemas de elucidación utilizadas fueron metanol:diclorometano (7:3) y acetato de etilo: ácido acético: acido fórmico: agua (25:1:1:2). Se utilizó al radical 2.2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) como revelador de actividad antioxidante, además de reveladores como el cloruro de aluminio ($AlCl_3$), cloruro férrico ($FeCl_3$), dragendorff y vainillina, para evidenciar flavonoides, fenoles, alcaloides y terpenos respectivamente.

La lectura de las placas se llevó a cabo en una lámpara de UV a 340nm (Anexo 4).

Identificación por espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN)

Como apoyo al análisis fitoquímico se realizó una técnica de espectroscopia de RMN. Para esto fueron pesados 30 mg del extracto metanólico y enviado a la Universidad Tecnológica de la Mixteca, Huajuapan de León, Oaxaca para su procesamiento. Los espectros de protones de H-1 y C-13 del extracto metanólico fueron tomados en un espectrómetro Bruker de 400 MHz Avance III, empleando como disolvente metanol deuterado (CD_3OD). Los datos se procesaron en el software Topspin 4.0.6.

Actividad antioxidante por la técnica del radical 2.2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) en microplaca

Para determinar la concentración efectiva 50 (CE_{50}) de los extractos y fracciones capaces de reducir el 50% de radicales DPPH, se realizó una técnica a microescala según lo descrito por Granados-Guzmán en 2017, por medio de espectrofotometría UV-Vis a una longitud de onda de 517 nm en placas de 96 pozos.

Para esto, se prepararon soluciones de los extractos y fracciones a una concentración de 1 mg mL^{-1} en etanol (EtOH). De esta solución se tomó 0.1 mL y se adicionó en un pozo con 0.1 mL de EtOH; a partir de esta solución se realizó una serie de diluciones seriadas (factor 1:2) por 11 pozos más. A cada uno de los pozos se les agregó 0.1 mL de DPPH (280 μM) y se dejó reposar por 15 min en obscuridad, para su posterior lectura en el lector de placas Multiskan FC (Thermo Scientific).

Se utilizó una solución de quercetina 1 mg mL^{-1} como control positivo y etanol como control negativo.

Para determinar la CE_{50} se calculó la capacidad reductora de los extractos. La capacidad reductora se determinó por medio del porcentaje de reducción mediante la siguiente ecuación:

$$\%\text{ de reducción: } \frac{\text{absorbancia del control negativo} - (\text{absorsbancia de la muestra})}{\text{absorbancia del control negativo}} \text{ x } 100$$

Los porcentajes de reducción se graficaron versus la concentración del extracto en cada pozo; del gráfico generado se calculó la ecuación de la recta y se determinó la concentración del extracto necesaria para obtener un 50% de reducción.

El extracto o fracción que presentó mejor actividad antioxidante fue seleccionada para realizar el ensayo *in vitro.*

Cultivo celular

La conservación de la línea celular se realizó según la metodología descrita por Delgado, 2013.

Para la obtención de la alícuota de la línea celular HepG2, fueron distribuidos en varios frascos de cultivo con medio de cultivo DMEM Advanced con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de antibióticos (penicilina y estreptomicina) y 1% de LGlutamina; una vez obtenida una confluencia del 70-80% se retiró el medio con ayuda una bomba de aspiración. Posteriormente, se lavaron las células dos veces con buffer de fosfatos en solución salina (PBS); enseguida agregar 1 mL de tripsina y se incubaron por 5 min a 37°C con 5% de CO_2.

Pasado 5 minutos se adicionó 6 mL de medio de cultivo DMEM con SFB al 10% para neutralizar la tripsina; dicha solución se colectó en un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugó durante 5 min a 2000 rpm y a 25 °C de temperatura**.**

Una vez centrifugado se decantó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 4 mL de medio de cultivo.

Para el conteo de células viables se realizó una dilución 1:10 de la suspensión celular; en un tubo eppendorf se agregó 20 µL de la suspensión celular a una mezcla de 170 µL de medio y 10 µL de azul tripano.

Se tomó un volumen indefinido de la dilución la cual se distribuyó por capilaridad en una cámara de Neubauer. Para el conteo solo se tomaron en cuenta las células vivas encontradas en los cuadrantes 1, 2, 3 y 4 (figura 4) de la cámara que no estuvieran teñidas con el colorante.

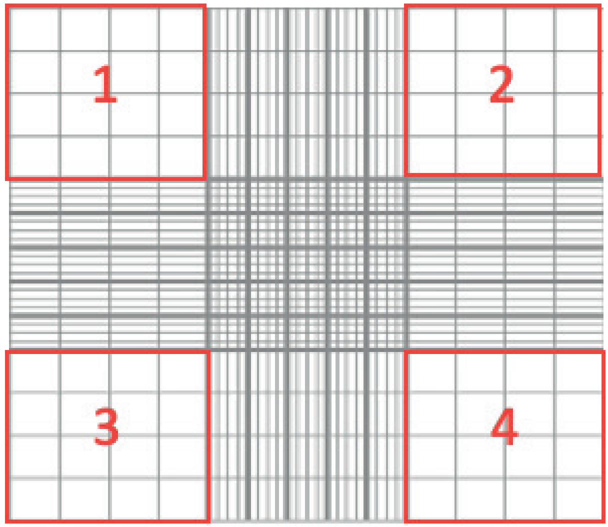


Figura 4. Cuadrantes de lectura en la cámara de Neubauer.

Para determinar la cantidad de células presentes en un mililitro se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\#células}{ml} = \frac{total\ de\ células}{4}(factor\ de\ dilución)(10^4)$$

Modelo de daño con CCl_4

Según la metodología descrita por Delgado 2013, en placas de 6 pozos agregó 1 millón de células/pozo, a las 12 h de haber agregado las células se retiró el medio y se lavaron con PBS. Se agregaron 12 μL de CCl_4 para inducir el daño en un tiempo determinado de 2 h.

Las soluciones de CCl_4 se realizaron en PBS con DMSO al 0.05%. Después de 2 h de exposición de las células con el CCl_4 se retiró el sobrenadante para llevarlo a la cuantificación AST.

Modelo hepatoprotector

- **Cuantificación de la enzima aspartato amino transferasa (AST)**

Según la metodología descrita por Delgado 2013, en placas de 6 pozos se sembraron 1 millón de células, se incubaron 12 horas a 37°C 5% CO_2 y a las 12 horas se retiró el medio y se lavaron con PBS. Posteriormente se agregaron las soluciones del extracto metanólico, la fracción 2 y silimarina disueltos en PBS al 0.1% de DMSO para obtener una

concentración final de 100 μg mL^{-1}. Esto se incubó durante 1 hora a 37 °C y 5% de CO_2. Pasado este tiempo se retiró la solución y se adicionó CCl_4; se dejó actuar por 2 horas en incubación, una vez pasado ese tiempo se retiró el sobrenadante e inmediatamente se realizó la cuantificación enzimática de AST.

Análisis estadístico

Todos los datos se presentaron como media ± desviación estándar (DE), utilizando el programa STATA versión 14.0. Se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) para determinar diferencia estadística entre los tratamientos de cada grupo, considerando un nivel de confianza del 95% y un valor de significancia del $p<0.05$. Los datos fueron graficados utilizando el programa GraphPad Prism v.5.

RESULTADOS

Obtención y purificación de extractos

Se realizó la extracción sólido líquido a partir de muestra seca, mediante el equipo Soxhlet, utilizando como solventes, metanol y AcOEt:hexano (50:50). Se obtuvieron dos extractos, un extracto metanólico (P) y un extracto de AcOEt:hexano (AC) (tabla 2), los cuales posteriormente fueron sometidas a un sistema de rotaevaporación para la eliminación del solvente restante.

El extracto metanólico fue sometido a una columna de gel de sílice y eluída con metanol, acetato de etilo y hexano, de la cual fueron obtenidas 8 fracciones (fracción 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8) (tabla 2).

Del extracto metanólico obtenido fueron tomados 3 g de muestra y llevados a un proceso de hidrólisis ácida y transcurrido 2 horas de reflujo se obtuvo un compuesto llamado extracto hidrolizado (H), este último, fue sometido a una columna cromatográfica y eluída con metanol y acetato de etilo, de la cual finalmente, se colectaron 2 fracciones (tabla 2), la fracción metanólica llamada fracción hidrolizada 1 (Hidrolizado 1) y una fracción de acetato de etilo llamada fracción hidrolizada 2 (Hidrolizado 2).

Muestra	Extracción	Hidrólisis	Purificación
Corteza de *Mimosa lacerata*	Metanol	--------	Metanol Acetato de etilo Hexano
		Hidrolisis ácida	Metanol Acetato de etilo
	Acetato de etilo: hexano	----	------------

Tabla 2. Proceso de extracción y purificación de *M. lacerata*.

Cromatografía en capa fina

Se realizó una cromatografía en capa fina de los extractos y fracciones obtenidas utilizando diferentes reveladores, solventes y sistemas de elución, donde fue posible identificar la presencia de alcaloides utilizando dragendorff como revelador, se encontraron también, compuestos terpenicos utilizando el revelador vainillina, estos dos compuestos encontrados en el extracto metanólico y el extracto hidrolizado, además se pudo observar un desplazamiento similar de los compuestos de la misma muestra al utilizar el mismo sistema de elución con diferentes reveladores.

Asimismo, el cloruro férrico ($FeCl_3$) reveló la presencia de compuestos fenólicos para las fracciones 2-7 y el extracto metanólico, mientras que el cloruro de aluminio ($AlCl_3$) permitió la observación de flavonoides en las fracciones 3 a la 7 y el extracto metanólico.

Por último, se determinó presencia de compuestos antioxidantes con el revelador DPPH, en el cual el cambio a color amarillo indica la reducción del radical libre de este revelador, y donde fue posible observar una mayor actividad antioxidante para las fracciones 2-7 y en el extracto metanólico.

El resultado final del tamizaje fitoquímico se resume en la tabla 3, que muestra la ausencia de compuestos fenólicos y alcaloides para el caso de la fracción 1, 8, H1, H2 y AC; así como también, una baja actividad antioxidante.

Cabe mencionar, que para las fracciones 2-7 y el extracto metanólico se observó la interferencia de metabólicos desconocidos.

	Compuesto	Alcaloides	Terpenos	Flavonoides	Fenoles	DPPH
Extractos	P	+++	+++	+++	+++	+++
	AC	N	N	-	-	+
	H	++	++	N	N	N
Fracciones	1	N	N	-	-	+
	2	N	N	-	+	++
	3	N	N	++	++	++
	4	N	N	++	++	++
	5	N	N	+++	+++	++
	6	N	N	++	++	++
	7	N	N	+	+	++
	8	N	N	-	-	-
	H1	N	N	-	-	+
	H2	N	N	-	-	+

Poco (+), regular (++), abundante (+++), negativo (-), prueba no realizada (N) Extracto metanólico (**P**), extracto de acetato de etilo (**AC**), extracto hidrolizado (**H**), fracción hidrolizada 1 (**H1**), fracción hidrolizado 2 (**H2**).

Tabla 3. Tamizaje fitoquímico para los extractos y fracciones de *M. lacerata*

Actividad antioxidante mediante la técnica de DPPH en microplaca

Para confirmar la actividad antioxidante de las muestras se determinó la CE_{50}, para la cual fue necesario calcular la capacidad reductora del extracto metanólico, las fracciones 1-8, así como de H1, H2 y AC. Como control positivo se utilizó quercetina y como blanco etanol (EtOH).

Los porcentajes de reducción se graficaron versus la concentración del extracto en cada pozo del gráfico generado, se calculó la ecuación de la recta y se determinó la concentración del extracto necesaria para obtener un 50% de reducción (tabla 4).

MUESTRA	CE_{50} ($\mu g\ mL^{-1}$)
Quercetina	4.02 ± 1.29
EXTRACTO METANóLICO	4.58 ± 2.96
Fracción 1	9.15 ± 4.11
Fracción 2	5.59 ± 1.85
Fracción 3	5.62 ± 1.12
Fracción 4	5.67 ± 4.96
Fracción 5	6.64 ± 1.47
Fracción 6	25.40 ± 7.75
Fracción 7	15.43 ± 6.02
Fracción 8	92.67 ± 8.14
Hidrolizado 1	10.57 ± 7.21
Hidrolizado 2	13.43 ± 6.82

Tabla 4. Actividad antioxidante de los extractos y fracciones

Los resultados son mostrados como media ± SD n=3

Se observó una buena actividad antioxidante para las fracciones las fracciones 1-7, principalmente para las fracciones 2-5 y en el extracto metanólico; así como de ambos compuestos hidrolizados, esto al comparar con la quercetina. El extracto metanólico y la fracción 2, fueron seleccionados para su posterior uso en el ensayo *in vitro*, ya que presentaron una actividad antioxidante sobresaliente.

Actividad hepatoprotectora

Se evaluó la actividad hepatoprotectora del extracto metanólico y la fracción 2 de *M. lacerata* en la línea celular HepG2, a una sola concentración; como inductor de daño se utilizó CCl_4 y como control positivo de hepatoprotección se utilizó silimarina.

A una hora del pretratamiento con el extracto metanólico y la fracción 2, con 100 $\mu g\ mL^{-1}$, se observó una disminución significativa ($p<0.05$) en la actividad enzimática de AST comparada con el grupo control a daño. Esta reducción, en la actividad de AST, es similar a

la mostrada en el grupo tratado con silimarina a la misma concentración, como se muestra en la figura 5.

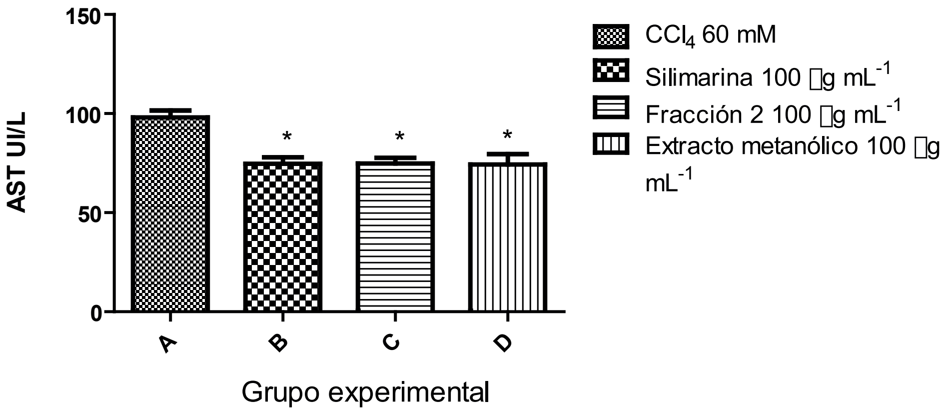


Figura 5. Efecto hepatoprotector *in vitro*. Pretratamiento a 1 hora de silimarina (**B**) fracción 2 (**C**) y el extracto metanólico (**D**) en células HepG2 con daño inducido por CCl_4 a 60 mM. *significativamente diferente ($p<0.05$), comparado con el grupo control de daño (**A**).

Identificación por RMN

Para confirmar el tamizaje fitoquímico, el extracto metanólico fue sometido a una espectrometría por RMN para RMN-1H y RMN-1C. La selección del extracto metanólico para esta prueba fue en base a su actividad antioxidante mostrada por la técnica de DPPH en microplaca, la cual fue sobresaliente.

En la lectura correspondiente se observaron señales para carbonos aromáticos en 115.13 y 129.5 ppm, varias señales bases de oxígeno características de azúcares y una señal del carbono 4 del anillo C (CH_2) alrededor de 28.99 ppm; además, se observan correlaciones entre el CH_2 del anillo C (H-4) con un carbono aromático (C6) C-Ar y uno base de oxígeno (C3), que indica la presencia de compuestos de tipo tanino como se observa en el espectro de coherencia de enlace múltiple heteronuclear (HMCB por sus siglas en inglés) (figura 6).

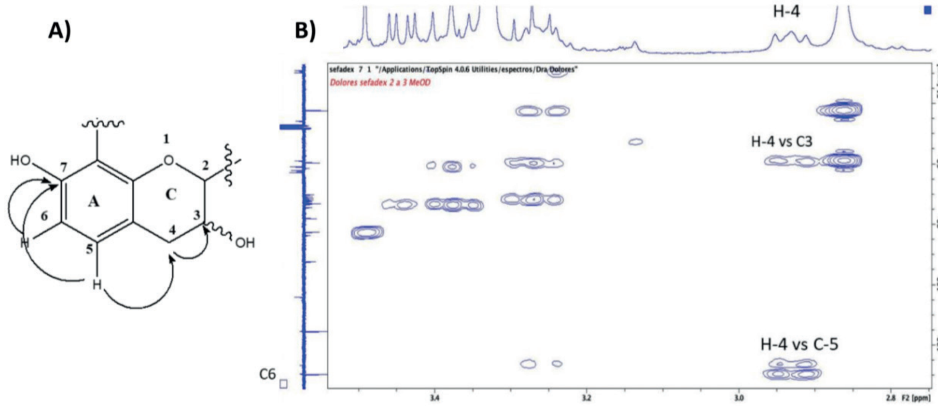


Figura 6. Espectro bidimensional de HMBC. A) molécula elucidada B) señales de relación de los núcleos13-C y 1-H.

DISCUSIÓN

La hepatotoxicidad de diferentes tipos y orígenes constituye un importante problema de salud pública, por lo que la necesidad de tener nuevos esquemas de tratamiento es un factor importante para detener el progreso de estas afecciones, tal como el uso de productos naturales que han demostrado ser una excelente fuente para la obtención de compuestos antioxidantes y coadyuvar al tratamiento de estas enfermedades (Nwidu *et al*., 2018).

Por esta razón, la fitoterapia ha llevado a la búsqueda de alternativas, orientadas a la protección del hígado de efectos originados por hepatotoxinas, aumentando el número de estudios para la evaluación de extractos herbales en distintos modelos experimentales (Torres-González *et al*., 2014).

Para este fin la extracción, purificación y caracterización son pasos muy importantes en la preparación de muestras naturales y el estudio de sus propiedades biológicas (Revathy *et al*., 2011). En el presente estudio el uso de estas técnicas permitió el análisis de extractos y fracciones de la corteza de *M. lacerata* a distinta polaridad, donde los extractos obtenidos a baja polaridad con acetato de etilo y hexano mostraron tener baja capacidad de reducción del radical DPPH, es decir una escasa actividad antioxidante (tabla 4); sin embargo, los compuestos con una alta polaridad obtenidos con metanol, en especial el extracto metanólico y la fracción 2, mostraron tener mejor capacidad de reducción del radical DPPH con una CE50 4.58 μg mL^{-1} y CE50 5.59 μg mL^{-1} respectivamente, tomando como referencia a la quercetina (tabla 4), una clase de flavonoide que tiene la capacidad de prevenir o retrasar condiciones que favorecen el estrés oxidativo en la célula, al reducir los niveles de ROS y MDA (Alía *et al*., 2006).

En el primer estudio fitoquímico de *M. lacerata* se identificó la presencia de compuestos flavonoides, terpenos y taninos obtenidos de la corteza, además de observar

una actividad antimicrobiana y antioxidante (Mendoza-Sabino, 2016; Mayo *et al*, 2018). En el presente estudio, se confirmaron compuestos fenólicos y flavonoides, en especial para el extracto metanólico y la fracción 5, ambos con una buena actividad antioxidante (tabla 3 y 4). En relación a esto, se han reportado grandes cantidades de flavonoides provenientes de la corteza de extractos herbales (Pereira *et al.*, 2016), junto a una buena actividad antioxidante (Dykes y Rooney, 2007); así mismo, los compuestos fenólicos como taninos son obtenidos de extractos herbales y utilizados medicinalmente por su actividad diurética (Patel, 2011), antiproliferativa (Rolim *et al.*, 2018) antimicrobiana y antioxidante (Maisetta *et al.*, 2019).

De igual manera se encontraron compuestos terpenicos y alcaloides para el extracto metanólico, este último reportado con un gran potencial antioxidante, incluso más fuerte que los fenoles (Gan *et al.*, 2017), en cuanto a los terpenos, se ha demostrado que poseen una actividad protectora hepática contra la inflamación, el estrés oxidativo y apoptosis en una lesión hepática *in vivo* (Huang *et al.*, 2019).

La presencia de compuestos fitoquímicos como alcaloides, terpenos, flavonoides y fenoles encontrados en el extracto metanólico, además de una buena actividad antioxidante, fue el motivo de su selección para realizar el estudio *in vitro* junto a la fracción 2, la cual de igual manera mostró una buena actividad antioxidante, seguida del extracto metanólico (tabla 4).

Estudios previos realizados por Gonzáles *et al.*, 2017, han demostrado que el daño hepático causado por CCl_4 a 1.5 horas de exposición en células HepG2 se encuentra asociado con un aumento significativo de AST, esto debido a la toxicidad de sus compuestos reactivos o metabolitos (Nwidu *et al.,* 2018), que provocan una disminución en la integridad estructural del hígado (Liu e*t al.,* 2018). Este hecho, puede atribuirse a su localización en el citoplasma y mitocondria, pues un daño mitocondrial con acumulación de ROS tiende a aumentar el nivel de AST, conllevando a una destrucción celular (Hu *et al.*, 2014). Datos similares fueron obtenidos en este estudio en el grupo control de daño, donde las células HepG2 fueron tratas con CCl_4 en un tiempo de 2 horas, lo que provocó un incremento en los niveles de AST, indicativo de un daño celular hepático; sin embargo, este daño fue disminuido significativamente ($p<0.05$) con el tratamiento previo de 1 hora con el extracto metanólico y la fracción 2 a una concentración de 100 $\mu g\ mL^{-1}$ (figura 5), lo que pudiera reflejar un efecto protector a la destrucción celular causada por el CCl_4. Este efecto puede atribuirse al alto contenido antioxidante demostrado tanto para el extracto metanólico como para la fracción 2, lo que pudiera conferirle una protección considerable contra el estrés oxidativo, pues se ha demostrado que extractos derivados de plantas, que muestran una buena actividad antioxidante son buenos agentes hepatoprotectores (Torres-González *et al.,* 2011).

Cabe mencionar que, la reducción significativa de AST entre el extracto metanólico y la fracción 2 fue muy similar, de igual modo con el grupo tratado a 1 hora con silimarina a

una concentración de 100 μg mL^{-1}, ya que su administración previa redujo el efecto tóxico del CCl_4 a 60 mM. Este resultado es similar a lo observado en 2017 por Gonzales *et al*, en donde el tratamiento a 150 μg mL^{-1} con silimarina redujo significativamente una lesión hepática causada por CCl_4 a 40 mM, en la misma línea celular en un tiempo de 1.5 horas. Lo anterior indica que una concentración menor de silimarina puede reducir significativamente un daño celular causado por CCl_4 en un menor tiempo, por lo que aumentar la concentración del extracto metanólico o la fracción 2, así como el tiempo de exposición, podría disminuir aún más el efecto tóxico causado por el CCl_4 y por consiguiente mantener la integridad celular del hepatocito. Otros estudios *in vivo* también han demostrado que la silimarina protege contra las lesiones causadas por el CCl_4 (Li, 2012), efecto que se ha atribuido a su capacidad de eliminación de radicales libres (Anthony y Saleh, 2013), a la regulación de la apoptosis al generar cambios en la proporción Bax/Bcl-2 y a su papel en el proceso inflamatorio en la inhibición de NFkB (Federico *et al*., 2017).

Debido a la actividad biológica demostrada por *M. lacerata* en el ensayo *in vitro,* fue de importancia la elucidación del compuesto responsable de dicha actividad, para esto se seleccionó al extracto metanólico para ser sometido a una espectroscopía de RMN de 13-C y 1-H. Gracias a esto fue posible observar la presencia de compuestos aromáticos, una estructura con una dispersión similar a lo encontrado por Pizzi y Stepahno en 1993 al estudiar el tanino de la corteza de acacia negra (*Acacia mearnsii*) perteneciente a la familia Fabaceae, donde se encontraron taninos poliméricos compuestos de unidades de fisetinidina/robonetidina, denominados polímeros de profisetinidina/prorobinetidina respectivamente. Lo anterior puede sugerir la presencia de un tipo de polímero condensado tipo profisetinidina o prorobonetidina en el extracto metanólico de *M. lacerata* muy similar al de *A. mearnsii.* El extracto crudo de la corteza de acacia negra ha demostrado una fuerte capacidad de eliminación de radicales libres por el método DPPH (Shen *et al*., 2010). Este efecto ha sido comprobado por Huang y colaboradores en 2010 al analizar un dímero de prorobonetidina denominada robinetinidol- (4β → 8) -epigalocatequina 3-O-galato (REO), el cual previene la activación de caspasa 3, protege contra el daño oxidativo mitocondrial, reduce la generación de ROS y aumenta la producción de GSH.

La presencia de polímeros de profisetidina o prorobonetidina presentes en el extracto metanólico podrían jugar un papel importante al contrarrestar el efecto toxico provocado por el CCl_4. Sin embargo, la presencia de metabolitos interferentes observados en el tamiz fitoquímico del extracto metanólico (tabla 3), podrían bien interferir o estar implicados en el efecto protector hepático, considerando que la acción biológica de una planta a veces no puede deberse a uno solo de sus principios activos, si no a la interacción sinérgica de las moléculas presentes e incluso podrían mostrar una actividad más efectiva en forma de mezcla que cuando se utilizan de forma individual (Rosales *et al.,* 2017).

Por lo anterior, es de interés seguir investigando la presencia de nuevos metabolitos presentes en *M. lacerata,* así como sus mecanismos específicos de acción.

CONCLUSIONES

- Fueron obtenidos por elucidación, dos extractos de alta y mediana polaridad, ocho fracciones y dos compuestos hidrolizados de la corteza de *M. lacerata*.
- El estudio fitoquímico del extracto metanólico de *M. lacerata* evidenció la presencia de alcaloides, terpenos, fenoles y flavonoides.
- Los extractos y fracciones que presentaron una mejor actividad antioxidante fueron el extracto metanólico (CE_{50} de 4.58 μg mL^{-1}) y la fracción 2 (5.59 μg mL^{-1}) de *M. lacerata*.
- El pretratamiento a 1 hora con el extracto metanólico y la fracción 2 a 100 μg mL^{-1}, mostró un efecto protector significativo contra el daño inducido por CCl_4 en la línea celular HepG2 al evaluar la concentración de AST.

REFERENCIAS

Alexandre, J., Nicco, C., Batteux, F. (2017). Oxidative Stress, in: Schwab, M. (Ed.), Encyclopedia of Cancer. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 3335–3338.

Alía, M., Mateos, R., Ramos, S., Lecumberri, E., Bravo, L., Goya, L., (2006). Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *Eur. J. Nutr.* 45: 19–28.

Almazroo, O.A., Miah, M.K., Venkataramanan, R. (2017). Drug Metabolism in the Liver. *Clin. Liver Dis*. 21: 1–20.

Anthony, K.P., Saleh, M.A. (2013). Free Radical Scavenging and Antioxidant Activities of Silymarin Components. *Antioxidants.* 2: 398–407.

Camargo, S.L., Grether, R., Martínez, A., García, V., Barrios, S. (2001). Especies Útiles del Género Mimosa (Fabaceae-Mimosoideae) en México. *Bol. Soc. Bot. México.* 68: 33–44.

Carreño-Hidalgo, P.C. (2016). La etnobotánica y su importancia como herramienta para la articulación entre conocimientos ancestrales y científicos. (Tesis de licenciatura). Universidad distrital Francisco José De Caldas. pp. 5-10

Dara, L., Liu, Z.-X., Kaplowitz, N. (2016). Mechanisms of Adaptation and Progression in Idiosyncratic Drug Induced Liver Injury, Clinical Implications. Liver Int. Off. J. *Int. Assoc. Study Liver.* 36: 158–165.

David, S., Hamilton, J.P. (2010). Drug-induced Liver Injury. US Gastroenterol. *Hepatol. Rev*. 6: 73–80.

Delgado, C. (2013). Aislamiento biodirigido de compuesto(s) con actividad hepatoprotectora a partir de*Turnera diffusa*. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo león. pp. 26-46.

Dykes, L., Rooney, L.W. (2007). Phenolic Compounds in Cereal Grains and Their Health Benefits. *Cereal Foods World*. 53: 105-111

Fathy, M., Khalifa, E.M.M.A., Fawzy, M.A. (2019). Modulation of inducible nitric oxide synthase pathway by eugenol and telmisartan in carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Life Sci.* 216: 207–214.

Federico, A., Dallio, M., Loguercio, C. (2017). Silymarin/Silybin and Chronic Liver Disease: A Marriage of Many Years. *Molecules* 22: 191-199.

Figueroa, M.C., Zafimahova, A., Alvarado, P.G.M., Dubreucq. E., Poncet., (2015). Grape seed and apple tannins: emulsifying and antioxidant properties. *Food chem.* 178: 38-44.

Fox, S.I. (2013). Human physiology, 13th ed. ed. McGraw-Hill, New York, NY.pp. 486-48.

Gan, J., Feng, Y., He, Z., Li, X., Zhang, H., (2017). Correlations between Antioxidant Activity and Alkaloids and Phenols of Maca *(Lepidium meyenii). J. Food Qual*. 2017: 1–10

Gómez-Lechón, M.J. (2017). Modelos celulares hepáticos avanzados para el estudio preclíno del metabolismo y la hepatotoxicidad de fármacos. *An. Real Acad. Nac. Farm*. 83: 255–267.

Gómez-Pompa, A. (1993). Las raíces de la etnobotánica mexicana. *Acta Biol. Panamensis* 1: 87–100.

González, L.T., Minsky, N.W., Espinosa, L.E.M., Aranda, R.S., Meseguer, J.P., Pérez, P.C., (2017). In vitro assessment of hepatoprotective agents against damage induced by acetaminophen and CCl_4. *BMC Complement. Altern. Med*. 17: 1-10.

Granados-Guzmán, G., Salazar-Aranda, R., Garza-Tapia, M., Castro-Ríos, R., Waksman de Torres, N. (2017). Optimization and Validation of Two High-Throughput Methods Indicating Antiradical Activity. *Curr. Anal. Chem*. 13: 499–507.

Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspects Med*. 27: 1–93.

Hañari-Quispe, R., Arroyo, J., Herrera-Calderón, O., Herrera-Moran, H. (2015). Efecto hepatoprotector del extracto hidroetanólico atomizado del maíz morado (Zea mays L.) en lesiones hepáticas inducidas en ratas. *An. Fac. Med.* 76: 123–128.

Hansen, J.T., Netter, F.H., Machado, C.A.G., Craig, J.A., Perkins, J.A. (2015). Netter: anatomía clínica, 3rd ed. Elsevier Masson, España. pp. 34-35

Hu, J., Ramshesh, V.K., McGill, M.R., Jaeschke, H., Lemasters, J.J. (2016). Low Dose Acetaminophen Induces Reversible Mitochondrial Dysfunction Associated with Transient c-Jun N-Terminal Kinase Activation in Mouse Liver. *Toxicol. Sci*. 150: 204–215.

Hu, Z., Lausted, C., Yoo, H., Yan, X., Brightman, A., Chen, J., et al (2014). Quantitative Liver-Specific Protein Fingerprint in Blood: A Signature for Hepatotoxicity. *Theranostics* 4: 215–228.

Huang, W., Ding, H., Chen, L.-Y., Ni, L., Ruan, Y.-F., Zou, X.-X., et al. (2019). Protective Effect of the Total Triterpenes of Euscaphis konishii Hayata Pericarp on Bacillus Calmette-Guérin Plus Lipopolysaccharide-Induced Liver Injury. Evid.-Based Complement. *Altern. Med*. 2019: 1-15.

Huang, W., Niu, H., Xue, X., Li, J., Li, C. (2010). Robinetinidol-(4β →8)-epigallocatechin 3-O-gallate, A Galloyl Dimer Prorobinetinidin From *Acacia Mearnsii* De Wild, Effectively Protects Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells Against Acrolein-Induced Oxidative Damage. *J. Alzh. Dis 21*: 493-506.

Isaza, J. (2007). Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et technica*. 1: 54-62.

Jia, R., Cao, L.-P., Du, J.-L., Wang, J.-H., Liu, Y.-J., Jeney, G., et al (2014). Effects of carbon tetrachloride on oxidative stress, inflammatory response and hepatocyte apoptosis in common carp (Cyprinus carpio). *Aquat. Toxicol.* 152: 11–19.

Kamalian, L., Chadwick, A.E., Bayliss, M., French, N.S., Monshouwer, M., Snoeys, J., Park, *et a*l. (2015). The utility of HepG2 cells to identify direct mitochondrial dysfunction in the absence of cell death. *Toxicol In Vitro* 29: 732–740.

Karamalakova, Y.D., Nikolova, G.D., Georgiev, T.K., Gadjeva, V.G., Tolekova, A.N. (2019). Hepatoprotective properties of Curcuma longa L. extract in bleomycin-induced chronic hepatotoxicity. *Drug Discov. Ther.* 13: 9–16.

Li, Chia., Hsiang, Chien., Wu, Shih y Ho, Shih-Lu. (2012). Food and Chemical Toxicology. *Food Chem Toxicol*. 5: 1568-1575

Liu, W., Wang, Z., Hou, J., Zhou, Y., He, Y., Jiang, S., et al (2018). The Liver Protection Effects of Maltol, a Flavoring Agent, on Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Injury in Mice via Inhibiting Apoptosis and Inflammatory Response. *Molecules* 23: 2120.

López, A. (2018). Revisión taxonómica del género Mimosa (Leguminosae-Mimosoideae) en el estado de Guerrero, México. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana, México. pp. 73-147.

Ma, J.-Q., Ding, J., Zhang, L., Liu, C.-M. (2014). Hepatoprotective properties of sesamin against CCl_4 induced oxidative stress-mediated apoptosis in mice via JNK pathway. *Food Chem. Toxicol*. 64: 41–48.

Maisetta, G., Batoni, G., Caboni, P., Esin, S., Rinaldi, A.C., Zucca, P., (2019). Tannin profile, antioxidant properties, and antimicrobial activity of extracts from two Mediterranean species of parasitic plant Cytinus. *BMC Complement. Altern. Med*. 19: 1-11.

Marshall, W.J., Bangert, S.K., Lapsley, M. (2013). Bioquímica clínica. 7a ed, Elsevier, Barcelona. pp 85-103

Mayo, R.I., Vargas, D., Herrera, N., Rios, R., Damian, A., Godinez, F., *et al* (2018). Plant polyextracts against *Avibacterium paragallinarum* and *Pasteurella multocida*, causual agents of respiratory syndrome in chickens. *Wld. J. Pharm. Pharm. Sci. 7: 17-29.*

McKee, T., McKee, J.R. (2013). Biochemistry: the molecular basis of life, International 5. ed. ed. Oxford Univ. Press, New York. pp 309-336

Mendoza-Sabino, G. (2016). Etnobotanica y actividad antibacteriana de plantas medicinales de comunidades indígenas del estado de Guerrero. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Guerrero. pp. 15-28.

Navarro, V.J., Khan, I., Björnsson, E., Seeff, L.B., Serrano, J., Hoofnagle, J.H. (2017). Liver injury from herbal and dietary supplements. *Hepatology.* 65: 363–373.

Nwidu, L.L., Elmorsy, E., Oboma, Y.I., Carter, W.G. (2018). Hepatoprotective and antioxidant activities of Spondias mombin leaf and stem extracts against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *J. Taibah Univ. Med. Sci*. 13: 262–271.

Olsen, L., Oostenbrink, C., Jørgensen, F.S. (2015). Prediction of cytochrome P450 mediated metabolism. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 86: 61–71.

Oriakhi, K., Uadia, P.O., Eze, I.G. (2018). Hepatoprotective potentials of methanol extract of T. conophorum seeds of carbon tetrachloride induced liver damage in Wistar rats. *Clin. Phytoscience.* 4: 25.

Oroian, M., Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Res. Int.* 74: 10–36.

Pereira, C., Barros, L., Ferreira, I.C., (2016). Extraction, identification, fractionation and isolation of phenolic compounds in plants with hepatoprotective effects: Phenolic compounds from plants with hepatoprotective effects. *J. Sci. Food Agric.* 96: 1068–1084.

Pizzi, A., y Stephanou., A., (1993). A Comparative C13 NMR Study of Polyflavonoid Tannin Extracts for Phenolic Polycondensates. *J. Appl. Polym sci.* 50: 2105-2113

Ramachandran, A., Duan, L., Akakpo, J.Y., Jaeschke, H. (2018). Mitochondrial dysfunction as a mechanism of drug-induced hepatotoxicity: current understanding and future perspectives. *J. Clin. Transl. Res.* 4: 1–40.

Revathy, S., Elumalai, S., Antony, M.B. (2011). Isolation, Purification and Identification of Curcuminoids from Turmeric (curcuma Longa L.) by Column Chromatography. *J. Exp. Sci.* 2: 21–25.

Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M.A., Verde-Star, M.J. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. *Omn. Sci.*1: 6-36.

Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 66: 401–436.

Rodríguez, J.C., Rodeiro, I. (2014). El sistema citocromo P450 y el metabolismo de xenobióticos. *Rev. Cuba. Farm.* 48: 495–507.

Rolim, P.M., Fidelis, G.P., Padilha, C.E.A., Santos, E.S., Rocha, H.A.O., Macedo, G.R., (2018). Phenolic profile and antioxidant activity from peels and seeds of melon (Cucumis melo L. var. reticulatus) and their antiproliferative effect in cancer cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 51: 1-14.

Rosales, C.G., Soria, C., Pérez, M.I., Cedillo, L.Y., Huacuja, L., Miranda, M. L. (2017). Efecto hepatoprotector de una mezcla de siete plantas en cirrosis inducida con tetracloruro de carbono. *Rev. Cuba. Plts Med.* 22: 1-14.

Saito, J., Okamura, A., Takeuchi, K., Hanioka, K., Okada, A., Ohata, T. (2016). High content analysis assay for prediction of human hepatotoxicity in HepaRG and HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro.* 33: 63–70.

Sarangarajan, R., Meera, S., Rukkumani, R., Sankar, P., Anuradha, G. (2017). Antioxidants: Friend or foe? *Asian Pac. J. Trop. Med.* 10: 1111–1116.

Schwab, M. (2017). Encyclopedia of cancer, 4th edition. ed. Springer Berlin Heidelberg, New York, NY.

Selema, G., Martínez, J. (1999). Efecto hepatoprotector inducido por el flavonoide Astilbina frente a un modelo animal tratado con tetracloruro de carbono. *Rev. Cuba. Plts. Med.* 4: 36–39.

Shen, X., Wang, Y., Wang, F. (2010). Characterisation and biological activities of proanthocyanidins from the barks of *Pinus massonian* and *Acacia mearnsii. Nat. Prod. Res.* 4: 590-598.

Shehab, N.G., Abu-Gharbieh, E., Bayoumi, F.A. (2015). Impact of phenolic composition on hepatoprotective and antioxidant effects of four desert medicinal plants. *BMC Complement. Altern. Med.* 15: 401–413.

Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., Dhaka, N. (2013). Potential applications of antioxidants. *J. Pharm. Res.* 7: 828–835.

Singal, A.K., Jampana, S.C., Weinman, S.A. (2011). Antioxidants as therapeutic agents for liver disease. *Liver Int.* 31: 1432–1448.

Souki, A., Vargas, M.E., Gómez, A., Cano, C., García, D., Araujo, S., *et al.* (2015). Relación de la malnutrición por exceso con los niveles de óxido nítrico, malondialdehido y ácido úrico en niños y adolescentes. *Rev. Latinoam. Hipertens.* 10: 46-53.

Teschke, R. (2018). Liver Injury by Carbon Tetrachloride Intoxication in 16 Patients Treated with Forced Ventilation to Accelerate Toxin Removal via the Lungs: A Clinical Report. *Toxics* 6: 1–32.

Testa, B., Clement, B. (2015). Biotransformation Reactions and their Enzymes, in: The Practice of Medicinal Chemistry.*The pract of med chems*, pp. 561–584.

Testa, B., Pedretti, A., Vistoli, G. (2012). Reactions and enzymes in the metabolism of drugs and other xenobiotics. *Drug Discov.* 17: 549–560.

Tolosa, L., Jiménez, N., Pelechá, M., Castell, J.V., Gómez-Lechón, M.J., Donato, M.T. (2019). Long-term and mechanistic evaluation of drug-induced liver injury in Upcyte human hepatocytes. *Arch. Toxicol.* 93: 519–532.

Tolosa, L., Jiménez, N., Pérez, G., Castell, J.V., Gómez-Lechón, M.J., Donato, M.T. (2018). Customised in vitro model to detect human metabolism-dependent idiosyncratic drug-induced liver injury. *Arch. Toxicol.* 92: 383–399.

Torres-González, L., Elsa Muñoz-Espinosa, L., María Rivas-Estilla, A., Trujillo-Murillo, K., Salazar-Aranda, R., Waksman De Torres, N., et al. (2011). Protective effect of four Mexican plants against CCl_4-induced damage on the Huh7 human hepatoma cell line. *Ann. Hepatol.* 10: 73–79.

Torres-González, L., Torres, N.W., Pérez-Meseguer, J., Muñoz-Espinosa, L., Salazar-Aranda, R., Cordero-Pérez, P. (2014). Review of plants with hepatoprotective activity evaluated in Mexico. *Medicina universitaria*. 16: 78-86

Tortora, G.J., Derrickson, B. (2010). Principios de anatomía y fisiología. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. pp. 990-994

Tseng, T.-H., Lin, W.-L., Chang, C.-K., Lee, K.-C., Tung, S.-Y., Kuo, H.-C. (2018). Protective Effects of Morus Root Extract (MRE) Against Lipopolysaccharide-Activated RAW264.7 Cells and CCl_4-Induced Mouse Hepatic Damage. Cell. *Physiol. Biochem.* 51: 1376–1388.

Valencia-Avilés, E., Ignacio-Figueroa, I., Sosa-Martínez, E., Bartolomé-Camacho, M.C., Martínez-Flores, E., García-Pérez, M.-E. (2017). Polyphenols: antioxidant and toxicological properties. *Rev. Fac. Cienc. Quim.* 16: 15-29.

Vargas, D., Soto, M., González, V.A., Engelman, E.M., Martínez, A. (2006). Cinética de acumulación y distribución de flavonoides en guayaba (Psidium guajava L.). *Agrociencia* 40: 109–115.

Zeashan, H., Amresh, G., Singh, S., Rao, C.V. (2008). Hepatoprotective activity of Amaranthus spinosus in experimental animals. *Food Chem. Toxicol*. 46: 3417–3421.

Zeng, B., Su, M., Chen, Q., Chang, Q., Wang, W., Li, H. (2017). Protective effect of a polysaccharide from Anoectochilus roxburghii against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. J. *Ethnopharmacol*. 200: 124–135.

Zhu, B., Li, Y., Hu, T., Zhang, Y. (2019). The hepatoprotective effect of polysaccharides from Pleurotus ostreatus on carbon tetrachloride-induced acute liver injury rats*. Int. J. Biol. Macromol*. 131: 1–9.

SITIOS ELECTRONICOS

NCI Thesaurus, 2019. Tetracloruro de carbono. Consultado el 8 de marzo de 2019, página web: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C44350

PharmaBrand S.A. 2014. Simarín plus. Consultado el 12 de mayo de 2019, página web: https://www.pharmabrand.com.ec/index.php/profesionales-de-la-salud/vademecum/otc/simari-n-plus

UNA REVISIÓN CONCISA DEL GÉNERO *SARGASSUM C. AGARDH* CON GRAN POTENCIAL INDUSTRIAL. EXPERIENCIAS EN COSTA RICA

Data de aceite: 04/07/2023

Ruben Cabrera
Gabinete de Arqueología, Oficina del Historiador de la Ciudad, Habana Vieja, Cuba https://orcid.org/0000-0003-0089-1125.

Arsenio J Areces
Instituto de Geografía Tropical, Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, Municipio Playa, Ciudad Habana, Cuba.
https://orcid.org/0000-0001-9200-6271

Jhoana Díaz-Larrea
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Departamento de Hidrobiología
Ciudad de México, México.
https://orcid.org/0000-0003-4290-0835

Ricardo Cruz-Aviña
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP)
Tecamachalco, Puebla, México.
https://orcid.org/0000-0002-0905-9370.

RESUMEN: Existen numerosas oportunidades para que las innovaciones con el género *Sargassum* se consideren iniciativas de crecimiento sustentables que se pueden integrar en los marcos estratégicos y hojas de ruta de la economía sostenible. Esto puede respaldar la diversificación económica y la resiliencia para reducir la vulnerabilidad económica y la dependencia de un pequeño número de sectores, aumentar el número de asociaciones público-privadas en el ámbito de la investigación aplicada y el desarrollo de productos. Esto permitiría distribuir el riesgo de inversión mientras se maximiza la innovación. En este sentido, los países afectados por eventos de deriva de macroalgas pardas pueden utilizar esta biomasa en labores agrícolas.
Palabras Claves: arribazones, economía, *Sargassum*.

A CONCISE REVIEW OF THE GENUS *SARGASSUM C. AGARDH* WITH GREAT INDUSTRIAL POTENTIAL. EXPERIENCES IN COSTA RICA

ABSTRACT: There are opportunities for *Sargassum* innovations to be considered as blue growth initiatives which can be integrated into blue economy strategic frameworks and road maps. This can support economic diversification and resilience to reduce economic vulnerability and reliance on a small number of sectors.

Increase the number of public-private partnerships in the domain of applied research and product development. This would allow spreading the risk of investment while maximizing innovation. In this sense, countries affected by events of drift of brown macroalgae can use this biomass in agricultural work.

KEY WORDS: economy, drift, *Sargassum*.

INTRODUCCIÓN

Como la mayor parte de los miembros del género Sargassum, su identificación tradicional se apoya fundamentalmente en su morfología externa (Fig. 1 a, b) y al igual que los miembros del orden fucales, sólo la fase diploide es vegetativa y evidente, mientras que la generación haploide está reducida a los gametos microscópicos (Fig. 1c), y aunque usualmente los cigotos son retenidos en los receptáculos femeninos (CRITCHLEY & FLETCHER, 1997) su fecundación es externa.

Los miembros de este género suelen estar fuertemente adheridos al sustrato (Fig. 1b) por un sujetador en forma de cono o discoidal (en la mayoría de las especies) o por hachas rastreras (para el subgen. *Sargassum* sect. *Polycystae*). Las excepciones a la regla son: *Sargassum natans* (Linnaeus) Gaillon (Fig. 1 a) y *S. fluitans* (Børgesen) Børgesen que tienen hábitos pelágicos.

Esta condición de no depender de un sustrato para completar su ciclo vital, aunado a la elevación de la temperatura a nivel del mar ha ocasionado en muchas regiones costeras un aumento desmesurado que atenta, en algunos casos, con las actividades económicas locales (Fig. 1d).

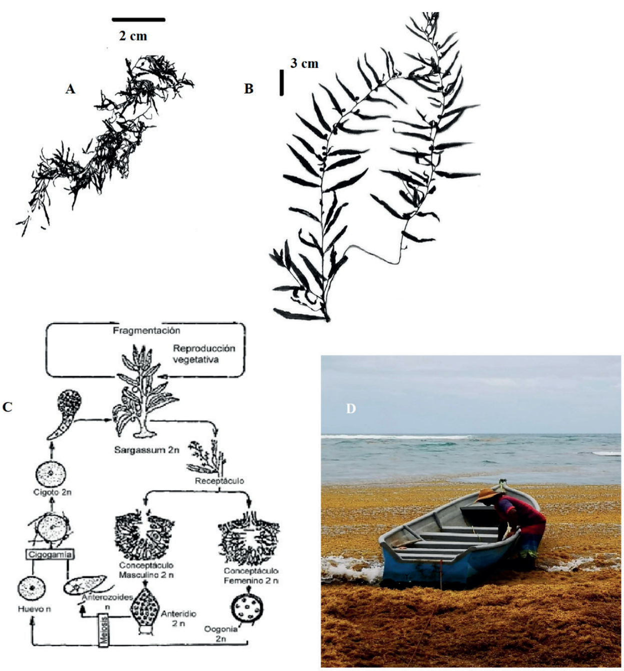


Figura 1. Aspectos generales del género *Sargassum.* **A**, especie pelágica *Sargassum natans.* **B**, especie bentónica *Sargassum filipendula* **var***. montagnei.* **C**, diagrama del ciclo de vida de *Sargassum***.** **D**, arribo de especies pelágicas al Caribe Sur de Costa Rica. [**Fuente**: CABRERA *et al.*, (2021)].

La gran diversidad de este grupo de macroalgas café en los países con economías emergentes como Costa Rica (Tabla I) ha generado varios intentos por aprovechar no solo la llegada masiva de arribazones, sino también se han realizado ensayos de cultivo con especies nativas, pero con resultados muy discretos CABRERA *et al.*, (2021).

Especie	Observaciones del estudio.	Primera referencia para Costa Rica.
Sargassum acinarium (Linnaeus) Setchell	(---)	SOTO & BALLANTINE (1986).
Sargassum buxifolium (Chauvin) M. J. Wynne	(---)	TAYLOR (1960).
Sargassum cymosum C. Agardh	(**)	KEMPERMAN & STEGENGA (1986).
Sargassum filipendula C. Agardh	(**)	KEMPERMAN & STEGENGA (1986).
Sargassum filipendula var. montagnei (Bailey) Grunow	(**)	CABRERA et al., 2021
Sargassum fluitans (Børgesen) Børgesen	(**)	DAWSON (1962).
Sargassum furcatum Kützing	(**)	CABRERA et al., (2019).
Sargassum hystrix J. Agardh	(*) (**)	TAYLOR (1960).
Sargassum hystrix var. spinulosum (Kützing) Grunow	(*)(**)	TAYLOR (1960).
Sargassum polyceratium Montagne	(---)	KEMPERMAN & STEGENGA (1986).
Sargassum polyceratium var. *ovatum* (Collins) W.R. Taylor	(*)(**)	DAWSON (1962).
Sargassum pteropleuron Grunow	(---)	SOTO & BALLANTINE (1986).
Sargassum rigidulum Kützing	(---)	SOTO & BALLANTINE (1986).
Sargassum natans (Linnaeus) Gaillon	(**)	CABRERA et al., 2021
Sargassum vulgare C. Agardh	(---)	KEMPERMAN & STEGENGA (1986).

Tabla I. Lista de especies del género *Sargassum* del Caribe Sur de Costa Rica. Especie empleada en cultivo experimental por CABRERA *et al.*, 2021 (*); especie arribada (**); especie registrada solo por la literatura (---).

Principales aportes del género *Sargassum* al espacio económico

Este es el primer intento de sumarizar las experiencias que, sobre los aspectos económicos positivos de la presencia de *Sargassum* han generado en el Caribe Sur de Costa Rica. Si bien la presencia de grandes arribos puede considerarse un desafío para las zonas afectadas por estos eventos hay ventajas que pueden obtenerse con un manejo adecuado de este fenómeno.

Para la dieta de animales en domesticación y silvestres

Las algas se han utilizado tradicionalmente en ganadería en numerosas partes del mundo, especialmente en zonas costeras, principalmente como complemento alimenticio para ganadería y también en acuicultura (INDERGAARD & MINSAAS, 1991).

En áreas donde los alimentos para animales eran escasos durante largos períodos del año, las ovejas, vacas y caballos pastaban algas marinas en seco (INDERGAARD & MINSAAS, 1991; DESROCHERS *et al.*, 2020). Todavía hoy, no es raro que los animales que viven en las zonas costeras consuman algas marinas para completar su dieta.

Los arribos de algas a las zonas costeras también son empleados por las aves no marinas para capturar peces u otros organismos muertos (Fig. 2). De igual modo, especies marinas como los pelicanos pueden usar las áreas costeras para establecer sitios de alimentación. En algunas ocasiones aprovechan los residuos de la pesquería de subsistencia como un subsidio que ofrece la actividad pesquera (Fig. 3).



Figura 2. *Coragyps atratus* (zopilote negro) alimentándose de organismos muertos asociados a los arribos de *Sargassum* spp.

Fuente: fotos CABRERA, R]



Figura 3. *Pelecanus occidentalis* (pelicano buchón) a la espera de residuos de pesquería en zona de arribo de *Sargassum* spp. [Fuente: fotos CABRERA, R]

Complemento alimenticio en animales domésticos

Los estudios científicos anteriores a la década de 1970 no lograron demostrar claramente las ventajas de incluir algas en dietas animales. Sin embargo, hoy en día una extensa investigación sobre los efectos de la incorporación de algas marinas directamente en la alimentación animal, así como la pulverización de extractos de algas sobre los forrajes, y los análisis detallados de las algas marinas, han demostrado que son ricos en proteínas, minerales, vitaminas, grasas poliinsaturadas ácidos, carbohidratos, fibras y compuestos bioactivos, y que pueden incrementar el crecimiento, desarrollo, productividad, salud general, inmunidad y la calidad del producto (EVANS & CRITCHLEY , 2014).

Los beneficios actualmente han sido documentados para una amplia gama de animales, incluyendo vacas, pollos, ovejas, cabras, caballos, conejos, patos, peces, camarones, ostras, moluscos y perros. Ejemplos de beneficios registrados en Costa Rica se resumen en:

Mayor peso del huevo, altura de la albúmina, grosor de la cáscara y contenido de ácidos grasos n-3, mejora en el color de la yema, contenido reducido de colesterol y triglicéridos en el huevo (WISCHNAT, 2013).

Como fertilizante de tierras de cultivo y composta

Las algas marinas se han utilizado como fertilizantes durante varios siglos, especialmente por las comunidades costeras (MCHUGH, 2003). Con el resurgimiento del interés en la agricultura orgánica, ha habido una creciente demanda de productos orgánicos, y como subproducto fertilizante se ha empleado en Costa Rica por parte de la población local (Fig. 4).

Se han realizado investigaciones sobre extractos de algas marinas y su uso beneficioso en horticultura, como el mejoramiento de la germinación y rendimiento, mayor absorción de nutrientes y resistencia a ciertas plagas (MC HUGH, 2003).



Figura 4. Procesamiento y preparación de tierras de cultivo con porcentajes de *Sargassum* spp. **A**, colecta del material en línea costera. **B**, secado del material con previo lavado para eliminar sales. **C**, preparación de zonas de camellones para el cultivo. [**Fuente**: fotos CABRERA, R].

REFERENCIAS

CABRERA R., DÍAZ-LARREA J., UMANZOR S. (2019). **New records of marine macroalgae on the Caribbean on coast of Costa Rica**. *American Journal of Plant Sciences.,* 10: 1708-1728, 3 figs, 1 table.

CABRERA, R., ARECES, A, J., DÍAZ-LARREA, J. (2021). ***Morfología de Sargassum.Arribazones y cultivo en Costa Rica***. Editorial Académica Española, 84 p.

CRITCHLEY A., FLETCHER J. (1997). ***Life cycle of the brown seaweed Sargassum* sp.** [www. https: //: consultado 20 de septiembre del 2020)] Department of Botany, University of the Witwatersrand, Johannesburg, Sudáfrica.

DAWSON E.Y. (1962). **Additions to the Marine Flora of Costa Rica and Nicaragua**. *Pacific Naturalist.*, 3: 375-395.

DESROCHERS A., COX S-A., OXENFORD H.A., VAN TUSSENBROEK B. (2020). ***Sargassum* uses guide: a resource for Caribbean researchers, entrepreneurs and policy makers**. Report prepared for the Climate Change Adaptation in the Eastern Caribbean Fisheries Sector (CC4FISH) Project of the Food and Agriculture Organization (FAO) and the Global Environment Facility (GEF). Centre for Resource Management and Environmental Studies (CERMES), University of the West Indies, Cave Hill Campus. Bridgetown: Barbados. 159 p.

EVANS, F. D., CRITCHLEY, A. T. (2014). ***Seaweeds for animal production use*.** *Journal of Applied Phycology* 26 (2): 891-899. doi: 10.1007/s10811-013-0162-9.

INDERGAARD, M., MINSAAS, J (1991). ***Animal and human nutrition***. En: Seaweed resources in Europe: uses and potential, edited by M. D. Guiry and G. Blunden, 432 pp. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. IT2 & ADEME. 2015.

KEMPERMAN T.C.M., STEGENGA H. (1986). **The Marine Benthic Algae of the Atlantic Side of Costa Rica. An Annotated, Updated and Enlarged Checklist**. *Brenesia.*, 25-26: 99-122.

MCHUGH, D. (2003). ***A Guide to the Seaweed Industry***. En: FAO Fisheries Technical Paper. Rome, Italy: FAO. 106 p.

SOTO R., BALLANTINE D. (1986**). La flora bentónica del Caribe de Costa Rica. (Notas preliminares)**. *Brenesia.,* 25-26: 123-126.

TAYLOR W.R. (1960). ***Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas.*** Ann Arbor: The University of Michigan Press. 870 p.

WISCHNAT S. (2013). **The potential use of pelagic algae (*Sargassum* spp.) as supplement to animal nutrition in coastal regions of Costa Rica. A case study of smallholder egg production systems on the Atlantic coast**. Master of Science Thesis, University of Hohenheim Faculty of Agricultural Sciences, 57 pp, Germany.

DANIELA REIS JOAQUIM DE FREITAS: Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2000), com mestrado em Biologia Celular e Molecular (2002), doutorado em Ciências (2006) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Durante o mestrado e o doutorado trabalhou diretamente com biologia celular e molecular e bioquímica, na clonagem e expressão de genes do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Também trabalhou com morte celular e estresse oxidativo no carrapato. Fez pós-doutorado na área de Ciências Médicas - Farmacologia (2007) na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Atualmente é professora Adjunta III na Universidade Federal do Piauí, no Departamento de Parasitologia e Microbiologia, líder do Grupo de Estudos em Microbiologia e Parasitologia (NUEMP) e membro do Núcleo de Pesquisa em Prevenção e Controle de Infecções em Serviços de Saúde (NUPCISS). Também é docente permanente do Programa de Pós-Graduação em Enfermagem (PPGEnf-UFPI). Tem experiência nas áreas de Biologia Celular e Molecular, Imunologia, Parasitologia, Microbiologia e Farmacologia Experimental e tem linhas de pesquisa em Controle de Infecções em Serviços de Saúde, Infecções comunitárias e Educação em Saúde.

ÍNDICE REMISSIVO

A

B

C

D

E

G

H

I

M

Principales temas de investigación en

Ciencias Biológicas

www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Atena Editora
Ano 2023

Principales temas de investigación en

Ciencias Biológicas

www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Atena Editora
Ano 2023